

Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

55. BAND, 3. HEFT

MIT 105 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 5. OKTOBER 1961)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GOTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z.
Zellforsch.

Preis DM 52,80

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von R. Goldschmidt und W. von Möllendorf. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von R. Goldschmidt, W. von Möllendorf, H. Bauer, J. Seiler. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von W. von Möllendorf und J. Seiler, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGSchen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von Max Schultze; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von v. La Valette St. George, W. Waldeyer; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von W. Roux, H. Braus, H. Spemann.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma“, Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie“ weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F I,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Heidelberg 1, Postfach 3027, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61 723

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319

55. Band

Inhaltsverzeichnis

3. Heft Seite

KUROSUMI, K., M. YAMAGISHI und M. SEKINE, Mitochondrial deformation and apocrine secretory mechanism in the rabbit submandibular organ as revealed by electron microscopy. With 10 Figures in the Text	297
RUCKES, J., Experimentelle Untersuchungen über die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale. Mit 36 Textabbildungen	313
JANSEN, W. F., and J. C. VAN DE KAMER, Histochemical analysis and cytological investigations on the coronet cells of the saccus vasculosus of the rainbow trout (<i>Salmo irideus</i>). With 8 Figures in the Text	370
SCHMIDT, W. J., und H. RUSKA, Elektronenmikroskopische Untersuchung der Pigmentgranula in den schillernden Federstrahlen der Taube <i>Columba trocaz</i> H. Mit 8 Textabbildungen	379
SCHULZ, H., und E. MACCLURE, Elektronenmikroskopische Untersuchung des <i>Trypanosoma cruzi</i> mit besonderer Berücksichtigung des Periplasten und des Blepharoplasten. Mit 17 Textabbildungen	389
KNESE, K.-H., und A.-M. KNOOP, Chondrogenese und Osteogenese. Elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen. Mit 26 Textabbildungen	413

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

From the Department of Anatomy, Gunma University School of Medicine, Maebashi, Japan

MITOCHONDRIAL DEFORMATION AND APOCRINE SECRETORY MECHANISM IN THE RABBIT SUBMANDIBULAR ORGAN AS REVEALED BY ELECTRON MICROSCOPY

By

K. KUROSUMI, M. YAMAGISHI and M. SEKINE

With 10 Figures in the Text

(Received February 27th, 1961)

I. Introduction

The origin of secretory granules in the sweat gland has long been ascribed to mitochondria based upon the results of light microscopy (NICOLAS et al. 1914, MINAMITANI 1941). On the other hand, the Golgi apparatus has been assumed to be the site of first appearance of secretory granules in some glands such as the exocrine pancreas and salivary glands (HIRSCH 1939, JUNQUEIRA and HIRSCH 1956). Recent advances in the cytology of gland cells with the electron microscope have led to the concept that protein secretion may be produced initially in the ergastoplasm (rough surfaced part of the endoplasmic reticulum) and then transported into the Golgi apparatus, where the secretion may become discrete visible granules (HAGUENAU 1958, PALAY 1958, KUROSUMI 1961). Mitochondria are thought to participate in the synthesis of secretory materials merely indirectly by their content of oxidative enzymes (HAGUENAU 1958).

Is this the case in sweat glands also? In human sweat glands, both of apocrine and eccrine type, the senior author and his collaborators (KUROSUMI et al. 1958b, 1959) found two kinds of secretory granules; one of these (light secretory granules) is apparently derived from mitochondria, but the other (dark secretory granules) may be produced within the Golgi vacuole or the cisterna of the smooth surfaced endoplasmic reticulum. There remained, however, a doubt whether the light secretory granules might represent merely a sort of degenerating mitochondria irrelevant to the secretory activity. On the other hand, direct continuity between the dark secretory granules and mitochondria suggestive of a transition between them has been found in the further course of observations on human axillary apocrine glands. As mentioned above, it seems possible that the mitochondria may be actively involved in the synthesis of the secretory product in the human sweat gland. The study of animal sweat glands presented here may shed more light on the problem debate.

There is another problem in regard to this type of skin glands, that is, the mechanism of release of secretion. BARGMANN and KNOOP (1959) and BARGMANN, FLEISCHHAUER and KNOOP (1961) postulated that the apocrine mechanism of secretion discharge known in light microscopical morphology might not exist in the mammary gland. The electron microscopy of the typical apocrine gland of the rabbit, the submandibular organ (SCHAFER 1940), may contribute to the question of so-called apocrine secretion.

II. Material and methods

The submandibular organs of adult male rabbits were surgically removed without anesthesia, and dipped into chill fixative. The specimen was immediately cut into small pieces, less than 1 mm³, within the fixative using two razor blades. The fixative was 1% osmium tetroxide buffered to pH 7.4 with acetate-veronal and made isotonic with sucrose according to the method of CAULFIELD (1957). The specimens were kept in the fixative for 1–2 hours at about 4°C. Then they were washed briefly with isotonic buffer solution, and dehydrated through a series of alcohol of increasing concentration. Embedding was carried out into a mixture of *n*-butyl methacrylate and methyl methacrylate in the ratio of 7:3, to which was added 2% benzoyl peroxide as polymerizing catalyst. Cutting was performed by means of JUM-5 ultra-microtome with self-made glass knives. Thin sections less than 0.03 μ thick selected by interference color were observed under the electron microscope, JEM-5, without extraction of embedding media. The objective aperture of the electron microscope is 0.05 mm and the accelerating potential used is either 50 or 80 KV. The micrographs were taken at 1,800 to 9,200 times in electronic magnification, and thereafter enlarged photographically as desired.

III. Observations

The submandibular organ of the rabbit is a conglomerated tubular gland lying in the subcutaneous tissue of the submandibular region and its excretory

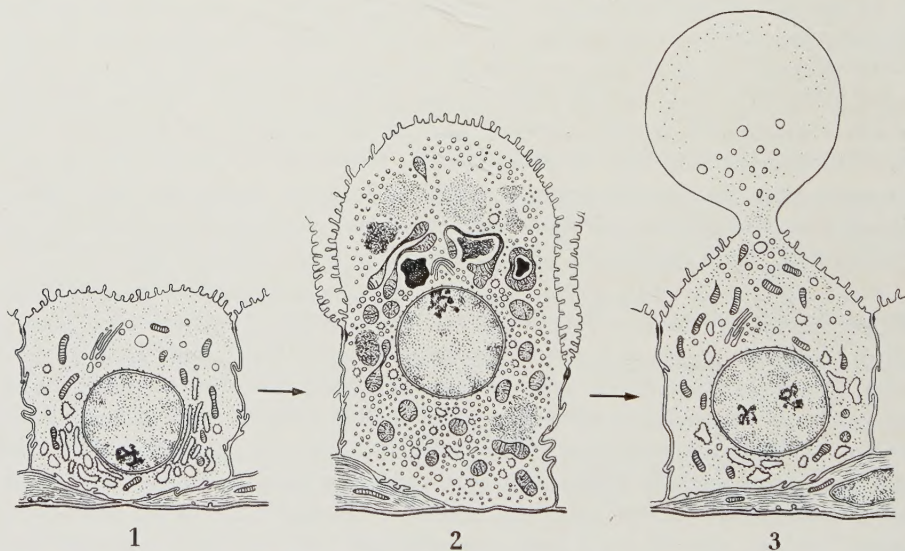


Fig. 1. Diagrammatic illustration showing the three successive functional stages of secretory cells of the rabbit submandibular organ. 1 The inactive resting stage; 2 the active synthesizing stage; 3 the stage of secretion discharge

duct opens on the surface of the skin. Each glandular tubule is lined with a simple columnar or cuboidal epithelium of secretory cells, which are further covered with a relatively thin sheet of myoepithelial cells. This sheet is not complete, but small gaps frequently occur between adjacent myoepithelial cells. The basement membrane invests the gland tubule being closely applied to the basal plasma membrane of the myoepithelial cells, or of the secretory cells where a gap in the myoepithelial sheet is present.

The shape as well as the size of the secretory cell is quite variable depending upon the functional state in the secretory cycle. Generally speaking, the cells

of any one glandular tubule are of the same state of secretory activity, but it varies from tubule to tubule. As a result of the present electron microscopic study accompanied by light microscopy, three distinct stages of functional activity may be noted as shown diagrammatically in Fig. 1.

1. *The resting stage.* Figure 2 shows a secretory cell at the inactive resting stage, of which a relatively low height of the secretory cell is characteristic.



Fig. 2. A secretory cell of the apocrine sweat gland (submandibular organ) of a rabbit at the resting stage. No secretory substance is contained in the cell. Mitochondria (*M*) are of small granular type or slender rod-shaped. Rough surfaced endoplasmic reticulum (*ER*) is rather well developed and arranged in approximately parallel lamellae at the basal part of the cell. *N* nucleus of the gland cell, *ME* myoepithelial cell, *L* gland lumen. $\times 10,000$

The free luminal surface of the cell is provided with a number of microvilli, which are roughly uniform in size and do not ramify in general. At the junction between adjacent cells, the surface membrane dips downward for some distance and forms intercellular crypts or canaliculi, which may become more pronounced when the cells enter the active synthesizing stage. The surface of the intercellular canaliculi is also adorned with numerous microvilli.

Secretion masses which are very conspicuous in active cells (Figs. 4—7) are quite absent in the cells of this stage (Figs. 2 and 3). Mitochondria at this

resting stage are characteristically small and slender. They are also few in number and randomly scattered through the cytoplasm. In rod-like or filamentous ones, cristae mitochondriales are usually crowded and oriented trans-

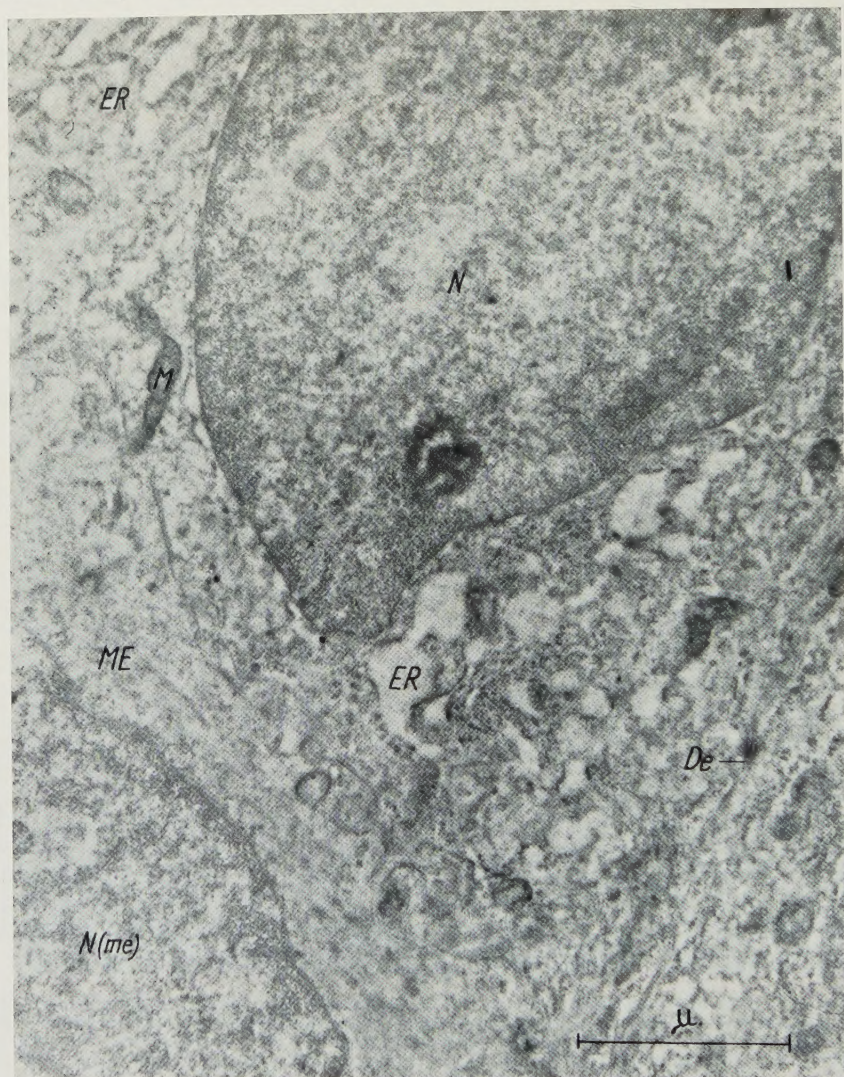


Fig. 3. Basal parts of secretory cells at the resting stage and one myoepithelial cell (*ME*) are illustrated. *N* nucleus of the secretory cell, *N(me)* nucleus of the myoepithelial cell. The endoplasmic reticulum of the rough surfaced type (*ER*) is well developed in the secretory cells, and mitochondria (*M*) are slender. *De* desmosome at the intercellular boundary. $\times 27,000$

versely. Rough surfaced cisternae of the endoplasmic reticulum are abundant in the basal zone of the cells at this stage. They are arranged in roughly parallel lamellae as shown in Fig. 3. Free scattered granules which may contain ribonucleoprotein (RNP granules or PALADE particles) are also observed.

In the supranuclear region, Golgi apparatus with well developed lamellar structures may be seen. Small Golgi vesicles are present also, but large vacuoles are rare.

2. *The synthesizing stage.* Figure 4 shows a cell at an early period of active synthesis. A single mass of secretory substance is observed. Hypertrophy of

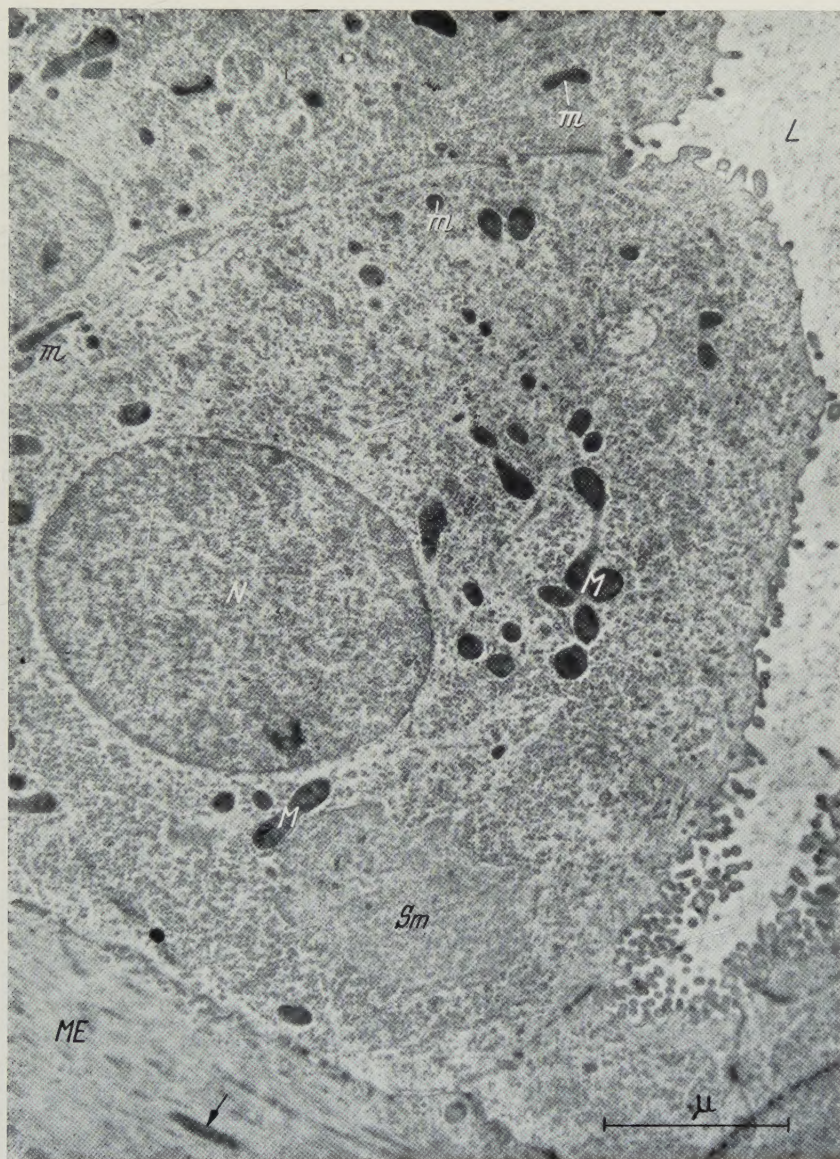


Fig. 4. A gland cell entering the stage of active synthesis of secretion. A single mass of secretory substance (*Sm*) is observed in this section. Some mitochondria (*M*) are enlarged, but slender ones (*m*) are still left. The hypertrophy of mitochondria becomes evident by comparison with those of a myo-epithelial cell (*ME*) which is indicated by an arrow. The cytoplasm of the secretory cell is filled with many small vesicles. *N* nucleus of the secretory cell, *L* gland lumen. $\times 24,000$

the mitochondria and abundance of tiny vesicles characterize this functional stage. In this figure many mitochondria are twice or three times as large in cross diameter as those found in the previous stage, but some are still small and

slender. The enlargement of these mitochondria becomes evident when they are compared with the mitochondria of a myoepithelial cell, which are of the

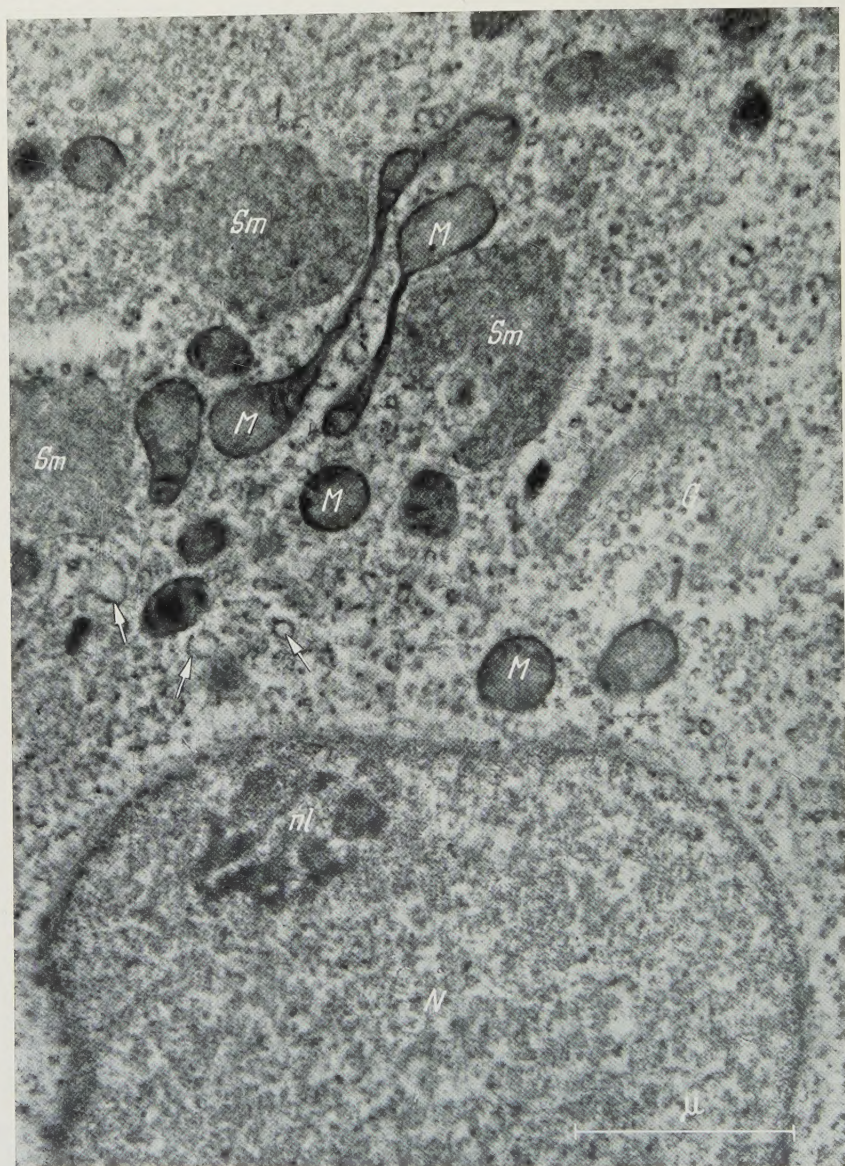


Fig. 5. Supranuclear region of a secretory cell at the stage of active synthesis. The nucleus (*N*) with peripherally situated nucleolus (*nl*) is observed at the bottom of the micrograph. The nuclear envelope is not clearly visible, because it was cut obliquely. Horseshoe-shaped Golgi apparatus (*G*) is seen above the nucleus. Mitochondria (*M*) are enlarged and some of them are deformed. Near the thin portion of such deformed mitochondria, masses of secretory substance (*Sm*) are observed. The cytoplasmic matrix contains many vesicles; the larger ones are rough surfaced (arrows), but many smaller vesicles are smooth surfaced. $\times 28,000$

same size as those of secretory cells in the resting stage. The hypertrophied mitochondria possess the normal attributes such as the cristae mitochondriales and intramitochondrial granules, but the matrix is rich in amount and the arran-

gement of cristae is rather sparse (Figs. 6 and 7). This suggests accumulation of some material within the mitochondria.



Fig. 6. Strong deformation of mitochondria (*M*) in a cell at the synthesizing stage. Distal portions of the deformed mitochondria are generally normal in structure, but the middle portion is very thin. Cristae mitochondriales in such thinned portions are arranged longitudinally. Large masses of secretion (*Sm*) are enveloped by thinned mitochondria, one of which is directly continuous with the secretion mass at the point indicated by the arrow. At this point the limiting membrane of the mitochondrion is obscure and the cristae are in disorder. The cytoplasmic matrix is filled with vesicles, most of which are smooth surfaced, while a few vesicles of relatively larger size are rough surfaced (*r*). $\times 45,000$

In the active stage of secretion, a peculiar deformation of the mitochondria is noticed as shown in Figs. 5 to 7. In Fig. 5 two mitochondria are elongated and thinned at their middle portion. Granular or homogeneous substance is aggregated

near such a thinned portion of the deformed mitochondrion. Fig. 6 demonstrates a more advanced degree of deformation in which horseshoe-like or annular curved

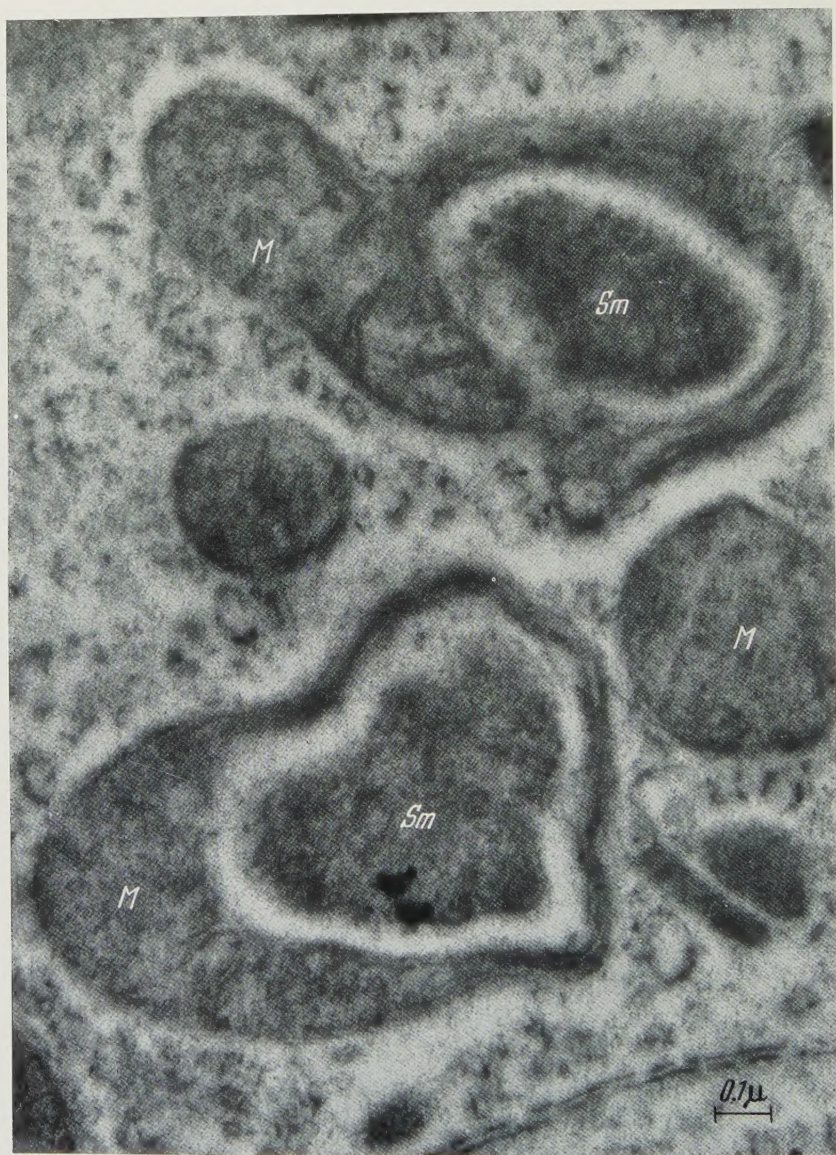


Fig. 7. Mitochondria (*M*) of the active synthesizing gland cell. Two of them completely encircle the masses of secretory substance (*Sm*) in this section, but in sections of other levels, it is possible that the mitochondrial envelope around the secretion mass may be open. Longitudinal arrangement of the cristae is apparent in the portion of the mitochondria surrounding the secretion. Other mitochondria are hypertrophied with abundance of matrix and sparse cristae, though not markedly deformed. The cytoplasmic matrix is filled with many smooth and rough surfaced vesicles. $\times 70,000$

mitochondria surround masses of a fine granular substance, which most probably is the secretory substance of this cell. The ends of such deformed mitochondria

are rather normal in structure with regularly arranged cristae and a distinct double limiting membrane. But the middle portion is very thin and wraps around the secretion mass leaving a narrow space between the mitochondrion and the secretion mass. Cristae mitochondriales run in longitudinal direction in such thinned portions. One can observe occasionally a direct continuity between the secretory substance and the thin portion of deformed mitochondria. As shown by an arrow, the cristae are disordered and the limiting membrane becomes obscure at the point of junction with the secretion mass; it looks as if the secretory substance bursts out from the mitochondrion. In Fig. 6 two mitochondria adjacent to each other wrap the secretion mass, but the mitochondria surrounding the secretions shown in Fig. 7 are single.

The thinned portion of the mitochondria seems not to be a strand so much as a relatively wide sheet. Two secretion masses illustrated in Fig. 7 appear to be completely surrounded by mitochondria. This may be a section through the peripheral part of the wrapped secretion masses, and it is possible that at another level the mitochondrial envelope may be open. It might be imagined that the mitochondrion wrapping the secretion is shaped like a half-empty tube of toothpaste whose middle is flat but whose ends are still filled.

The electron density and the internal texture of the secretion masses are considerably variable. Some are fine granular, but others homogeneous. Generally speaking, larger masses are low in density and usually homogeneous. It may be noted that small vesicular components which are abundant in the cytoplasmic matrix are inserted in the narrow space between the secretion mass and the surrounding mitochondrion, when the size of the secretion mass becomes larger and the degree of mitochondrial deformation become higher. It may be speculated that the mitochondrion retracts somewhat in this stage and that cytoplasmic vesicles may flow into the space between the secretion mass and the mitochondrion.

The second characteristic feature of the cell at the stage of active synthesis is the occurrence of a multitude of small vesicles (Figs. 4—7). Most of these are 20—80 $m\mu$ in diameter and smooth surfaced, viz. no particle is attached on the outer surface of these vesicles. They somewhat resemble smooth surfaced cisternae (vesicles) found in the gastric parietal cells (KUROSUMI et al. 1958a) and in the sebaceous gland cells (KUROSUMI et al. 1960), but are far smaller than these. Relatively large vesicles of about 100—300 $m\mu$ in diameter are intermingled, but they are few in number and rough surfaced (dense particles of about 150 Å are attached; Figs. 5 and 6). This type of vesicle is quite different from the smooth ones mentioned above, and can be considered to be derived from fragmentation and scattering of the rough surfaced endoplasmic reticulum which was restricted to the basal region and was orderly arranged in the cell at the resting stage. Such rough surfaced vesicles are so far apart from each other, that their interconnection can not be observed.

A Golgi apparatus consisting of small vesicles and flattened sacs is frequently observed near the deformed mitochondria surrounding secretion masses (Fig. 5), but no direct relationship with the secretion is recognized. As shown in Fig. 5, the nucleolus is situated peripherally in the nucleus often attaching to the inner surface of the nuclear envelope. The nucleolus tends to face the Golgi

apparatus and deformed mitochondria surrounding the secretion product. No sign of outflow of nucleolar material into the cytoplasm can be recognized.

3. *The stage of secretion discharge.* The characteristic of this stage are cytoplasmic projections from the free surface of the secretory cells into the gland

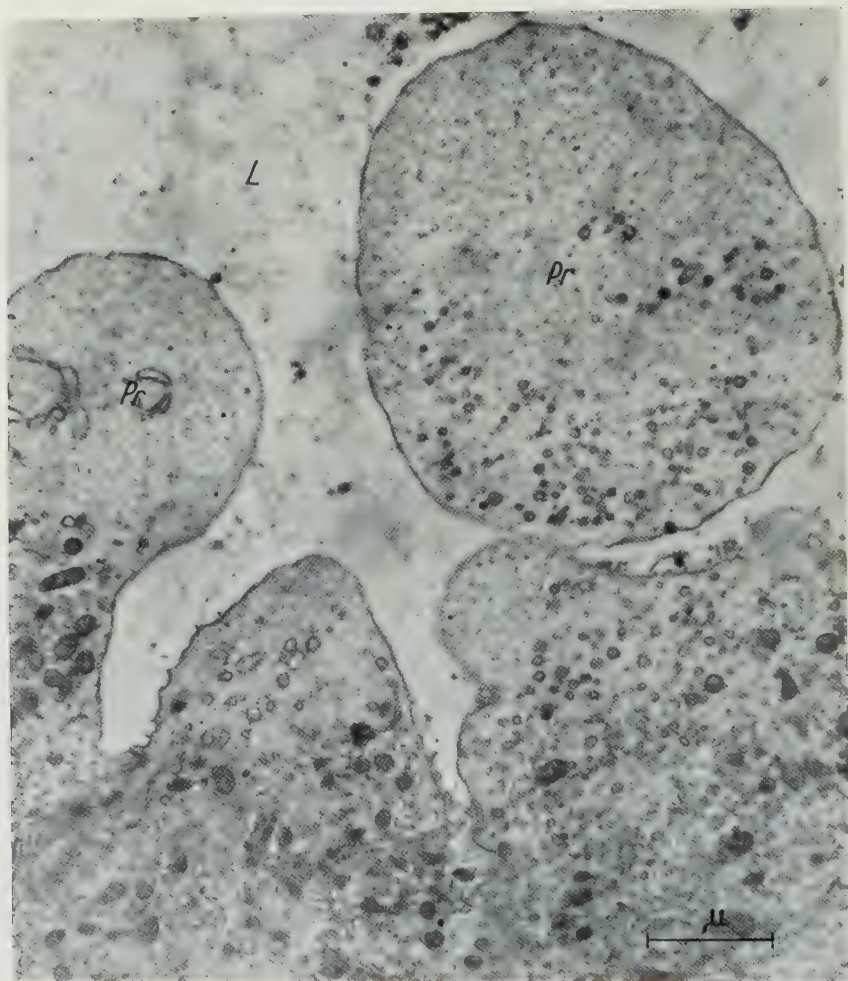


Fig. 8. Apical part of gland cells at an early stage of secretion discharge. Cytoplasmic projections (*Pr*) are bulging into the gland lumen (*L*). Small amount of smooth surfaced endoplasmic reticulum (mostly vesicular type) are observed within the projection, especially at the basal portion, which is otherwise homogeneous. Slender mitochondria are abundant in the main cell body, but do not enter into the projection. $\times 16,000$

lumen (Figs. 8—10). It is likely that the projections are filled with secretion material and destined to be detached from the main cell body. In the present study, no secretory substance has been observed as discrete bodies in the main body of the cell at this stage (Figs. 8—10). Secretion masses produced in the close spatial relationship with mitochondria, as described above, might be entirely liquefied at the beginning of this stage, and therefore no longer visible as masses

or granules. Such a liquefied substance may flow towards the top of the cell and accumulate immediately beneath the luminal surface membrane. Progressive accumulation may push the luminal plasma membrane to bulge out as a secretory

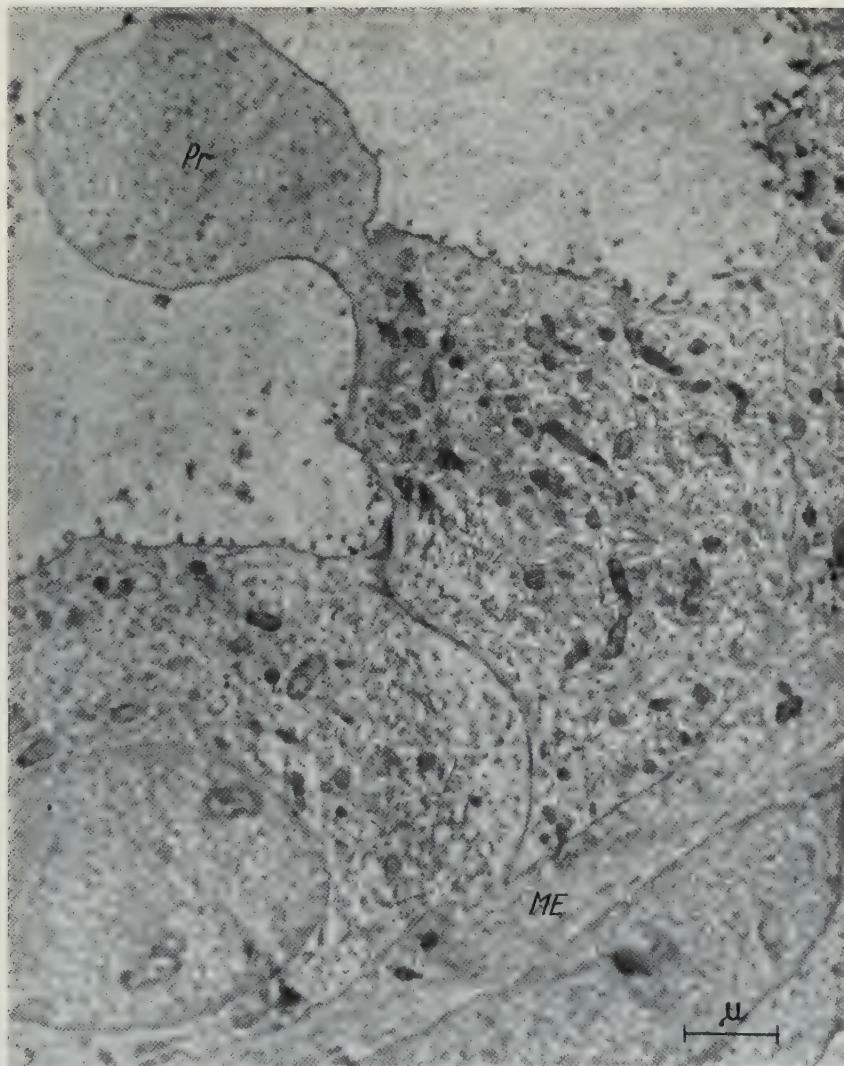


Fig. 9. A part of the rabbit submandibular organ at the stage of secretion discharge. A myoepithelial cell (*ME*) is seen at the lower right corner. Secretory cells contain slender mitochondria and many free RNP granules. Rough surfaced endoplasmic reticulum of vacuolar type is also numerous, but no secretion mass is seen in the main cell body. The cell in the right hand side shows no nucleus but a typical secretory projection (*Pr*) is shown. The projection is constricted at the base and ready to be detached. The interior of the projection is generally homogeneous. $\times 12,000$

projection. In cells showing an early stage of projection growth, the supra-nuclear cytoplasm is markedly dark (electron dense) and dull; this suggests diffusion of liquefied secretory substance.

Mitochondria at this stage are remarkably small and slender, but rather numerous as compared with the resting or synthesizing stages (Figs. 8 and 9).

They look like fragments of mitochondria. Smooth surfaced vesicles are much reduced in number. At the later period of this stage, rough surfaced cisternae of the endoplasmic reticulum are observed in appreciable amount and tend to occur at the basal half of the cell. Free scattered RNP granules are abundant.



Fig. 10. A huge apocrine secretory projection (*Pr*), the interior of which is generally homogeneous but contains some vesicles. At the constricted base of the projection (arrows), a larger of condensed cytoplasm is formed, from which the projection may fall off. Its surface is almost smooth with only a few rudimentary microvilli (*Mv*). $\times 17,000$

The luminal cytoplasmic projection is roughly round in shape like a balloon. Its surface is covered with a distinct plasma membrane which is generally smooth. As a rule, no microvilli are found on the projection surface, but in few exceptions only a small number of rudimentary microvilli were seen (Fig. 10). This absence

of microvilli is very characteristic of the secretory projection as compared with the ordinary cell surface (Figs. 8—10). The interior of the projection is generally homogeneous with moderate electron density. Smooth surfaced endoplasmic reticulum either vesicular or canalicular is sometimes contained in the basal part of the projection (Fig. 8), but this may disappear as the projection grows. Neither mitochondria nor Golgi apparatus and other cell organelles are present.

Figure 10 illustrates a fully developed projection whose neck, continuous with the main cell body, is characteristically condensed. Small membrane-like structures are seen in this dense area. The projection probably separates from the cell at this dense "demarcation zone".

IV. Discussion

Involvement of mitochondria in the synthesis of secretory material may be considered in two ways. One of these is indirect, as an energy source for the synthetic process on account of their content in oxidative enzymes. There can be no doubt about this way of mitochondrial participation in secretory activity in almost all types of gland cells. However, the other possible way in which the mitochondria may convert into the secretory granules, or the secretion may arise inside the mitochondria, has been doubted by some investigators (HAGUE-NAU 1958, PALAY 1958).

Mitochondrial changes suggestive of their participation in the production of secretory substances have been reported by some authors, especially concerning lipid secretion (LEVER 1955, DE ROBERTIS and SABATINI 1958, ROGERS 1957, KUROSUMI et al. 1960). Among them, DE ROBERTIS and SABATINI showed the most conspicuous degree of mitochondrial deformation in hamster adrenal cortex, which is very similar to that shown in the present paper. They demonstrated flattening and lamination of certain mitochondria which resulted in the formation of concentric lamellar chondriospheres, at the center of which occasionally several lipid droplets appeared. Close apposition of mitochondria to lipid droplets has been observed in liver (YAMAMOTO 1958, SUZUKI 1960, ARAKAWA 1961) and pancreatic cells (PALADE and SCHIDLowsKY 1958).

In spite of a great number of observations of such close topographical relationship between mitochondria and secretory or metabolic products within cells, it is still doubtful whether the mitochondria actually give rise to such products. LEVER (1955, 1957) repeatedly emphasized that lipid droplets in adrenocortical cells and in brown adipose tissue might arise from mitochondria. DE ROBERTIS and SABATINI (1958) did not ascribe the origin of lipid to the mitochondria, despite the occurrence of lipid droplets in the center of altered mitochondria (chondriosphere). NAPOLITANO and FAWCETT (1958) denied the mitochondrial origin of fat droplets of brown adipose tissue calling attention to possible illusions caused by the cutting angle. All the studies mentioned have not demonstrated hypertrophy of mitochondria prior to their deformation concurrent with the occurrence of cellular products. This is the case in the rabbit submandibular organ. Furthermore, light-microscopic observation revealed that the secretory substance of this organ contains lipid (weakly sudanophilic).

On the other hand, in certain other glands a close association between mitochondria and protein secretory substance was reported. For instance, enlargement

of mitochondria and their conversion into light (protein) secretory granules were demonstrated in human sweat glands (KUROSUMI et al. 1958b, 1959). This morphological change is very akin to the mitochondrial degeneration occurring in liver cells following intoxication with *Penicillium* poison (TAKAKI et al. 1959). Another type of sweat gland granules, dark (lipid) secretory granules, are also intimately associated with mitochondria.

Thus active participation of mitochondria in the synthesis of secretion is apparent in human sweat glands, but the mode of participation is slightly different from that in the apocrine glands of the rabbit. In the latter the secretory material might arise inside the mitochondria, whose enlargement suggests this, and then be discharged from the mitochondria accompanying their deformation. Extremely thinned parts of mitochondria may be the remains of organelles which have disgorged their content. Therefore, the first step of the process of secretion seems the same in the human and rabbit, but the final form is different.

From the fact that the smooth surfaced vesicles markedly increase at the stage of active synthesis, their function may be that of supplying raw material for the synthesis of secretion. In addition water is also transported by the vesicles. The shape and arrangement of the rough surfaced endoplasmic reticulum is remarkably altered during the active secretory phase. The Golgi apparatus is not changed, but the Golgi area is the site of mitochondrial deformation accompanied by the production of secretory substance. Thus the rough surfaced endoplasmic reticulum as well as the Golgi apparatus may also be involved in the secretory process though their rôle must be indirect and secondary. The nucleolus may also participate in some unknown way, as it is often observed at the side of the nuclear membrane facing the deformed mitochondria and secretory substance.

The luminal cytoplasmic projections presumably related to the apocrine mechanism of secretion were first noted under the electron microscope by BRAUNSTEINER et al. (1953) in the thyroid gland. They only described the morphology but did not refer to its functional significance. Since then this feature was reported in various gland tissues by many authors such as KITAMURA (1958) in pig's carpal organ, KUROSUMI et al. in gastric parietal cells (1958a) and in the human apocrine sweat gland (1959), IJIMA (1959) in the human eccrine sweat gland, NAKANISHI (1959) and SCOTT and PEASE (1959) in the ducts of salivary glands, and IRIE (1960) in the thyroid.

In the human sweat glands and other examples, functional states of secretory cells are not so clearly divided, and the so-called apocrine projection is not so frequently observed. By contrast, the submandibular organ of the rabbit shows very distinct stages of a secretory cycle as reported above. In any tubule at the stage of secretion discharge, every cell shows more or less marked secretory projections and the lumen contains pinched off pieces, as observed under both the light and electron microscopes. Moreover, evidence of liquefaction of the secretion mass appears in the early period of projection growth, and an apparent demarcation zone was observed at the base of a full-grown projection. Therefore, it seems no room is left for any doubt regarding the so-called apocrine secretory mechanism, at least in the case of apocrine sweat glands of this animal.

Summary

The submandibular organ (a sort of apocrine sweat glands) of the rabbit was observed with the electron microscope. The cell structure of glandular tubules varies depending upon the secretory activity; there are three functional stages. The secretory cells at the *resting stage* are characterized by low height, absence of secretory substance, and presence of small and slender mitochondria.

In the *synthesizing stage*, enlargement and peculiar deformation of mitochondria are observed. Secretory substance always occurs near the deformed mitochondria. The part of a mitochondrion closely abutting on the secretion mass is extremely thin, and contains longitudinally oriented cristae. Sometimes a direct continuity is observed between the thinned portion of the deformed mitochondria and the mass of secretory substance. It is presumed that the secretion is initially produced in the mitochondria and then discharged from them. The Golgi apparatus and the rough surfaced endoplasmic reticulum may be involved indirectly. Smooth surfaced vesicles, probably related to the transport of raw material, are extremely abundant in the cells of this stage.

The development of a generally homogeneous projection into the gland lumen is characteristic of the *stage of secretion discharge*. The mitochondria are again small and slender, and the secretion is liquefied. At the base of the full-grown projection, cytoplasm is condensed to form a demarcation zone from which the projection may become detached. This mechanism of release of secretory product is quite the same as the so-called apocrine secretory process long postulated by light microscopists.

References

- ARAKAWA, K.: Electron microscopy of the liver, a review. [Japanese.] *Sôgô Igaku* (Tokyo) **18**, 4—24 (1961).
- BARGMANN, W., K. FLEISCHHAUER u. A. KNOOP: Über die Morphologie der Milchsekretion. II. Zugleich eine Kritik am Schema der Sekretionsmorphologie. *Z. Zellforsch.* **53**, 545—568 (1961).
- , u. A. KNOOP: Über die Morphologie der Milchsekretion. Licht- und elektronenmikroskopische Studien an der Milchdrüse der Ratte. *Z. Zellforsch.* **49**, 344—388 (1959).
- BRAUNSTEINER, H., K. FELLINGER and F. PAKESCH: Electron microscopic observations on the thyroid. *Endocrinology* **53**, 123—133 (1953).
- CAULFIELD, J. B.: Effects of varying the vehicle for OsO_4 in tissue fixation. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 827—830 (1957).
- HAGUENAU, F.: The ergastoplasm, its history, ultrastructure, and biochemistry. *Int. Rev. Cytol.* **7**, 425—483 (1958).
- HIRSCH, G. C.: Form- und Stoffwechsel der Golgi-Körper. *Protoplasma Monographien*, Bd. 18. Berlin: Springer 1939.
- IJIMA, T.: Electron microscope studies on the eccrine sweat gland of human axillary skin. [Japanese.] *Acta anat. Nippon*. **34**, 649—672 (1959).
- IRIE, M.: Electron microscopic observation on the various mammalian thyroid glands. [Japanese.] *Arch. histol. jap.* **19**, 39—74 (1960).
- JUNQUEIRA, L. C. U., and G. C. HIRSCH: Cell secretion, a study of pancreas and salivary glands. *Int. Rev. Cytol.* **5**, 323—364 (1956).
- KITAMURA, T.: Electron microscope studies on the carpal organ of the pig. [Japanese.] *Arch. histol. jap.* **14**, 575—610 (1958).
- KUROSUMI, K.: Electron microscopic analysis of the secretion mechanism. *Int. Rev. Cytol.* **11**, 1—124 (1961).

- KUROSUMI, K., T. IJIMA and T. KITAMURA: Electron microscopy of the human eccrine sweat gland with special reference to the folding of plasma membrane. IV. Internat. Kongr. Elektr.-mikr., Berlin 1958b, Bd. 2, S. 361—365. Berlin: Springer 1960.
- T. KITAMURA and T. IJIMA: Electron microscope studies on the human axillary apocrine sweat glands. Arch. histol. jap. **16**, 523—566 (1959).
- and K. KANO: Electron microscopy of the human sebaceous gland. Arch. histol. jap. **20**, 235—246 (1960).
- S. SHIBASAKI, G. UCHIDA and Y. TANAKA: Electron microscope studies on the gastric mucosa of normal rats. Arch. histol. jap. **15**, 587—624 (1958a).
- LEVER, J. D.: Electron microscopic observations on the adrenal cortex. Amer. J. Anat. **97**, 409—420 (1955).
- The fine structure of brown adipose tissue in the rat with observations on the cytological changes following starvation and adrenalectomy. Anat. Rec. **128**, 361—372 (1957).
- MINAMITANI, K.: Zytologische und histologische Untersuchungen der Schweißdrüsen in der menschlichen Achselhaut. Okajimas Folia anat. jap. **21**, 61—94 (1941).
- NAKANISHI, T.: On the ultrastructure of the submaxillary gland of the guinea pig. [Japanese.] J. Chiba med. Soc. (Chiba) **35**, 474—492 (1959).
- NAPOLITANO, L., and D. W. FAWCETT: The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and rat. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 685—692 (1958).
- NICOLAS, J., C. REGAUD et M. FAVRÉ: Sur la fine structure des glandes sudoripares de l'homme, particulièrement en cas que concerne les mitochondries et les phénomènes de sécrétion. 17th Intern. Congr. Med., Sect. 13, Dermatol. Syphilis, 1914, pp. 105—109.
- PALADE, G. E., and G. SCHIDLowsKY: Functional association of mitochondria and lipid inclusions. Anat. Rec. **130**, 352—353 (1958).
- PALAY, S. L.: The morphology of secretion. In: Frontiers in Cytology (S. L. PALAY ed.), pp. 305—342. New Haven: Yale Univ. Press 1958.
- ROBERTIS, E. DE, and D. SABATINI: Mitochondrial changes in the adrenal cortex of normal hamsters. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 667—670 (1958).
- ROGERS, G. E.: Electron microscope observations on the structure of sebaceous gland. Exp. Cell Res. **13**, 517—520 (1957).
- SCHAFER, J.: Die Hautdrüsenorgane der Säugetiere. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1940.
- SCOTT, B. L., and D. C. PEASE: Electron microscopy of the salivary and lacrimal glands of the rat. Amer. J. Anat. **104**, 115—161 (1959).
- SUZUKI, Y.: An electron microscopic study on fat drop formation in the liver cell cytoplasm. J. Electronmicrosc. (Tokyo) **9**, 24—36 (1960).
- TAKAKI, F., H. SEKIGUCHI, Y. ONODERA, A. NAKAMURA and Y. HONGO: Electron microscopic studies on liver of mouse fed with *Penicillium islandicum* Sopp. [Japanese.] Denshi Kembikyo (Tokyo) **8**, 154—156 (1959).
- YAMAMOTO, T.: On the relationship between mitochondria and fat droplets in the hepatic cells of the mouse after administration of hydrocortisone. Arch. histol. jap. **15**, 625—632 (1958).

Prof. Dr. K. KUROSUMI,

Department of Morphology, Institute of Endocrinology,
Gunma University School of Medicine, Iwagami-chô, Maebashi, Japan

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. F. KLINGE)

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE RESORPTIONSFÄHIGKEIT DES STRATUM SYNOVIALE*

Von
J. RUCKES

Mit 36 Textabbildungen
(Eingegangen am 8. Mai 1961)

Inhalt	Seite
Einleitung	314
I. Entwicklung, Anatomie und Physiologie der Gelenkkapsel und des Stratum synoviale.	314
1. Entwicklung der Gelenke und des Stratum synoviale	314
2. Der Aufbau der Gelenkkapsel	314
a) Die Zotten und Falten S. 315. — b) Die Fettpolster S. 315. — c) Die bindegewebigen Abschnitte S. 315.	
3. Die Funktion der Gelenkzotten	315
4. Die Synovial„intima“.	316
5. Die Synovia	317
6. Die Gefäßversorgung der Gelenkkapsel	317
Die Innervation der Gelenkgefäße S. 317.	
7. Das Lymphsystem des Stratum synoviale und der Gelenkkapsel	317
8. Die Schmerzempfindlichkeit der Gelenke	318
II. Überlegungen bezüglich der Resorption von Flüssigkeiten aus Gelenken	318
III. Experimenteller Teil	320
1. Methodik und Versuchsanordnung	320
2. Die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale des nicht vorbehandelten Kaninchens	322
a) Versuche mit verschiedenen Injektionsmengen S. 322. — b) Versuche am toten Tier S. 323. — c) Messung der Aufnahme intraartikulär injizierter Testlösung in die Blutbahn S. 324. — d) Ergebnis der Versuche über die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale des nicht vorbehandelten Kaninchens S. 324.	
3. Versuche zur Klärung der hämatogenen oder lymphogenen Resorption aus der Gelenkhöhle	328
a) Die Resorption aus dem Kniegelenk nach Injektion von Adrenalin S. 329. — b) Die Resorption aus dem Kniegelenk nach intravenöser Injektion von Adrenalin S. 330. — c) Ergebnisse S. 333.	
4. Der Einfluß einer Dermatitis auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale	331
5. Der Einfluß einer Barbituratnarkose (Veronalnatrium, Evipannatrium) und des Muskelrelaxans My 301 (Guajakolglycerinäther) auf die Resorption	334
a) Der Einfluß der Veronalnatriumnarkose auf die Resorption S. 334. — b) Der Einfluß der Evipannatriumnarkose auf die Resorption S. 335. — c) Der Einfluß des Muskelrelaxans My 301 (Guajakolglycerinäther) auf die Resorption S. 335. — d) Ergebnisse S. 336.	
6. Der Einfluß des Cortison auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale	336
7. Die Wirkung intraartikulär injizierter Hyaluronidase auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale	338
8. Der Einfluß einer unspezifischen Fermentzündung auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale	345

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

9. Der Einfluß der unspezifischen und der allergisch-hyperergischen Arthritis auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale	347
a) Die Resorption aus der Gelenkhöhle bei der unspezifischen Arthritis S. 347.	
b) Die Resorption aus der Gelenkhöhle bei der allergisch-hyperergischen Arthritis S. 350.	
Besprechung	357
Zusammenfassung	360
Literatur	361

Einleitung

Das Stratum synoviale ist die Schicht der Gelenkkapsel, die durch die Bildung der Synovia nicht nur das reibungslose Spiel der knorpeligen Gelenkenden ermöglicht, sondern darüber hinaus die Ernährung von Teilen des Gelenkknorpels gewährleistet. Jede Alteration des Stratum synoviale, sei sie rheumatisch, degenerativ, durch ein Trauma oder entzündlich bedingt, muß deshalb früher oder später zu einer Schädigung der mit ihr gekoppelten bzw. von ihr abhängigen Gelenkteile führen. KLINGE (1933, 1934) lenkte die Aufmerksamkeit auf die primären Veränderungen in diesen Gelenkteilen hin, von denen sekundär Knorpel- und Knochenveränderungen und damit Erkrankungen des ganzen Gelenkes abhängig waren.

Während die Pathomorphologie der Gelenkerkrankungen durch die Arbeiten von KLINGE (1933, 1934), ALBERTINI (1929), DIETRICH (1929), SCHMIDT (1929) u. a. weitgehend bekannt ist, wissen wir über Physiologie und Pathophysiologie des Stratum synoviale sehr wenig. In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche berichtet, die sich mit der *Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale* unter verschiedenen Bedingungen befassen. Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war der Gedanke, daß mit der Sekretionsfähigkeit des Stratum synoviale naturgemäß eine *Resorptionsfähigkeit* gekoppelt sein mußte.

Die Auswertung experimentell gewonnener Daten setzt jedoch die genaue Kenntnis des Aufbaues und Zusammenwirkens der Einzelkomponenten des zu untersuchenden Objekts voraus. Es war deshalb wichtig, zunächst einen kurzen Überblick über Entwicklung, Anatomie und Physiologie der Gelenkkapsel und des Stratum synoviale zu geben, während im zweiten Teil eigene Untersuchungen und deren Ergebnisse niedergelegt sind.

I. Entwicklung, Anatomie und Physiologie der Gelenkkapsel und des Stratum synoviale

1. Entwicklung der Gelenke und des Stratum synoviale

Das Stratum synoviale entsteht aus demjenigen gefäßreichen Gewebe, das von der Gelenkhöhlenbildung in der 8.—9. Embryonalwoche, — also zu einem Zeitpunkt, an dem die endgültige Gelenkform schon festliegt, — verschont geblieben ist und sich retrahiert hat. Das Stratum synoviale ist somit der letzte Teil des „Gelenkgewebes“, der voll ausdifferenziert wird. Im Vergleich zur Kapsel und Skelettmuskulatur ist es jedoch das am wenigsten differenzierte Gewebe (DAVIES 1943).

2. Der Aufbau der Gelenkkapsel

Die gebräuchliche Unterteilung in Stratum fibrosum und Stratum synoviale wurde von HIDVEGI (1954) auf Grund vorwiegend gefäßarchitektonischer Untersuchungen ergänzt.

HIDVEGI unterteilt die Gelenkkapsel in vier Abschnitte. Er unterscheidet von innen nach außen:

1. Das Stratum villorum et plicarum.
2. Das Stratum capillare.
3. Das Stratum subsynoviale.
4. Das Stratum fibrosum.

HIDVEGI (1954) und LANG (1953, 1954, 1957) kamen unabhängig voneinander hinsichtlich der Gefäßarchitektonik zu im wesentlichen übereinstimmenden Ergebnissen. Beide Autoren gingen von dem Gedankengang aus, daß bei der Zusammensetzung der Synovia ein besonderes Gefäßnetz zu ihrer Bildung vorhanden sein müsse.

An Injektionspräparaten konnte LANG ein für die Gelenkkapsel, insbesondere für das Stratum synoviale typisches Gefäßnetz darstellen, das nach seiner Ansicht die Grundlage für die Bildung der Synovia und die Resorption darstellt.

Innerhalb eines Gelenkes sind nach KEY (1928), HIDVEGI (1954) und LANG (1957) verschiedene, nach Aufbau und Vaskularisation differente Bezirke des Stratum synoviale zu unterscheiden und zwar:

a) Die Zotten und Falten. Man findet sie in frei beweglichen Gelenken. Sie bestehen aus reichlich lockerem Bindegewebe, sind reich an Blut- und Lymphgefäßen und haben eine sehr große Oberfläche. Sie kommen vorwiegend im Bereich der Gelenkrecessus und zwischen den Fettpolstern vor und besitzen eine typische Gefäßversorgung. Aus den Basalarterien des subsynovialen Gewebes zweigen enge, gestreckt verlaufende Arteriolen in die Zotten ab. Sie gehen in weite, im venösen Teil aufgeknäuelte Kapillaren über, ohne daß sich ein eigentliches Capillarnetz ausbildet. Aus diesen Knäueln entspringen dicke Venen, die einzeln oder geteilt die Zotte verlassen und in den subsynovialen Venenkomplex münden. Es kommt nach HAGEN-TORN (1882) und LANG (1953) zwar vor, daß sich eine Kapillare gabelt und sich nach kurzer Verlaufsstrecke wieder zu einem einheitlichen Stamm vereinigt, jedoch sind in der Zotte keine Anastomosen zwischen zwei aus verschiedenen Arteriolen stammenden Kapillarknäueln nachgewiesen worden. LANG vergleicht diese Knäuel mit denen der Nierenglomerula, wie sie auch von HIDVEGI (1954) direkt als „Glomerula synovialia“ bezeichnet werden. Die Kapillarschlingen der Zotten und Falten liegen dicht unter der Synovialoberfläche und ragen an den Stellen, an denen ein Überzug aus Synovialzellen fehlt, „frei“ in die Gelenkhöhle. Sie sind jedoch nicht, wie HUETER (1866), HAMMER (1894) und HOFBAUER (1908) annahmen „nackt“, sondern immer mit einer dünnen Schicht Grundsubstanz bedeckt (KROH 1908, BAUMECKER 1932, LANG 1957).

b) Die Fettpolster. Sie finden sich vorwiegend in den großen Gelenken und sind charakterisiert durch eine Synovialzellschicht, die auf Fettzotten liegt. Eine subsynoviale Schicht fehlt. Es sind wenig Zotten, aber reichlich Synovialzellen vorhanden. Eine subsynoviales Gefäßsystem besteht nicht, dagegen aber ein ausgedehntes Kapillarnetz, das dem anderer Körperstellen entspricht.

c) Die bindegewebigen Abschnitte. Es sind die Teile des Stratum synoviale im Bereich der Sehnen und Bänder, an denen keine Zotten und Falten vorkommen. Die Vaskularisation ist gering. Die Verteilung dieser Abschnitte ist von Gelenk zu Gelenk verschieden. Die Vaskularisation ist sowohl bezüglich Zahl als auch Anordnung der Gefäße je nach Gebiet sehr unterschiedlich. Mechanisch stark beanspruchte Abschnitte sind gefäßarm, während an Stellen, an denen das Stratum synoviale unmittelbar über Sehnen verläuft, keine Kapillaren vorhanden sind.

An der Grenze von Stratum synoviale zu Gelenkknorpel findet man einen reichen Anastomosenkranz, der nach FISCHER (1933) zur Ernährung der peripheren Teile des Gelenkknorpels dienen soll, während die zentral gelegenen — von der Gelenkhöhle her betrachtet — Knorpelabschnitte durch die Synovia ernährt werden.

3. Die Funktion der Gelenkzotten

Die älteren Autoren betrachteten die Zotten als pathologische Gebilde, die nur zur Vergrößerung der Gelenkinnenfläche dienen sollten. SIBER (1932) sieht ihre Aufgabe darin, das Gelenk von Fremdeiweiß freizuhalten bzw. durch Quellung und Entquellung in den Bewegungsmechanismus eines Gelenkes einzugreifen. Auch DAVIES (1948, 1950) und LANG

(1954) vertreten für einen Teil der Zotten diese Ansicht. Die Entwicklungsgeschichte zeigt jedoch, daß sie sich bereits intrauterin bilden, und bis zur Geburt und weiterhin mit dem Alter zunehmen. Diese „Alterskurve“ der Synovialzotten, in Verbindung mit der Tatsache, daß sie nach Arthritiden zahlenmäßig zunehmen, deutet darauf hin, daß ihre Ausbildung mit der funktionellen Belastung der Gelenke in Verbindung steht. Ebenso deuten auch ihr typischer Aufbau und ihre Gefäßversorgung auf eine besondere Funktion hin.

Die direkt aus den Arteriolen entspringenden „Synovialglomerula“ und die nachgeschalteten Sperrvorrichtungen im venösen Abflußgebiet (LANG) lassen die Vorstellung vertretbar erscheinen, daß es sich um Organe handelt, die niedermolekulare Substanzen und Salze aus der Blutbahn in die Gelenkhöhle zu filtrieren vermögen. Es dürften demnach in den Synovialzotten wohldefinierte Organe vorliegen, in denen ein Teil der Synovia gebildet wird. Zur Erhaltung der normalen Gelenkmechanik muß ihre quantitative Ausbildung bei steigender Gelenkbelastung mit zunehmendem Alter und nach Arthritiden zunehmen, um die Funktion des Gelenkes durch vermehrte Bildung von Synovia und deshalb bessere Versorgung der einzelnen Gelenkteile, insbesondere des Knorpels, mit Nährstoffen aus dem Blut zu gewährleisten.

Eine Sekretion von Flüssigkeiten in eine geschlossene Höhle (Gelenk) ist mit einem Resorptionsmechanismus verbunden. Gefäßaufbau und Vaskularisation der flachen, bindegewebigen Abschnitte des Stratum synoviale und der Fettpolster, lassen vermuten, daß vor allem diese Bezirke der Resorption dienen. Es sei ausdrücklich betont, daß es hierbei um eine Arbeitshypothese handelt, die sich lediglich auf die mikroskopische Struktur und Angioarchitektur des Stratum synoviale bezieht. Diese Hypothese erhält eine weitere Stütze durch die Feststellung, daß das Verhältnis von Zotten zu Falten, von Gelenk zu Gelenk wechselt. Dieser Wechsel geht mit Unterschieden in der Viskosität der Synovialflüssigkeit einher.

Nach BYWATERS (1937) scheint ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration des Synovialmucins und der glykolytischen Aktivität der Zotten zu bestehen. BYWATERS gibt an, daß der Stoffwechsel der Gelenkzotten ähnlich dem der Fibroblasten und Osteoblasten ist. Die Glykolyse ist, übereinstimmend mit dem Sauerstoff-Stoffwechsel, bei einem Respirationsquotienten von 0,71—0,72 relativ hoch. Der Zellstoffwechsel ist der gleiche wie der anderen erwachsenen Gewebes.

Untersuchungen von RUCKES und REISSLAND (1960) ergaben für das Stratum synoviale des Kaninchens einen respiratorischen Quotienten von 0,81 bei einer anaeroben Glykolyse von 1,21 μ l. Die Atmung des Stratum synoviale verhält sich zu der des Gelenkknorpels wie etwa 4:1. Im Vergleich zum Herzmuskel als hochaktivem und der Brustaorta als passivem Gewebe zeigt sich, daß das Stratum synoviale in seiner Gewebsatmung zwischen beiden Geweben steht. Gemessen am Sauerstoffverbrauch muß deshalb dem Stratum synoviale eine aktive Leistung zugestanden werden.

Der Gelenkknorpel besitzt eine aktive Glykolyse, die pro Zelle die gleiche Größe hat wie die von erwachsenem Gewebe. In geringem Maße wird sie auch in Abwesenheit von Glukose aufrechterhalten. Der Gelenkknorpel verhält sich bezüglich seiner Dicke so, daß unter normalen Verhältnissen auch die innerste Lage von der Synovialflüssigkeit mit den lebensnotwendigen Substanzen versorgt werden kann. Bei abnehmender Permeabilität des Stratum synoviale oder bei Dickenzunahme des Knorpels unter anomalen Bedingungen ist eine ausreichende Ernährung des Knorpels durch die Synovia nicht mehr gewährleistet.

4. Die Synovial„intima“

Wenn auch die Abstammung der innersten Schicht des Stratum synoviale, der Synovial„intima“, vom Mesenchym nicht bezweifelt wird, so existieren doch über Aufbau und Benennung dieser Schicht heute noch verschiedene Ansichten. Es dürfte ohne wesentliche Bedeutung sein, ob diese Auskleidung nun als „modifiziertes Bindegewebe“ (HUETER, HAMMAR, BRAUN u. a.) oder als „modifizierte Knorpelzelle“ (MARQUORDT 1931), oder als „Synovioblast“ (VAUBEL 1933) angesehen wird. Auch die Frage nach ihrer Zugehörigkeit zum retikuloendothelialen System (Speicherung durch Synovialzellen) dürfte für die Physiologie des Stratum synoviale nicht allzu bedeutsam sein. Als vom Bindegewebe abstammend und dem Bindegewebe ähnlich dürfte eine fakultative Zugehörigkeit zum retikuloendothelialen System angenommen werden, ohne daß hinsichtlich ihrer eigentlichen Funktion als Synovialzelle

damit etwas Bindendes ausgesagt würde. Für die zu behandelnden Fragen bezüglich der Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale erscheint es von prinzipieller Bedeutung, daß die innere Auskleidung des Stratum synoviale keine geschlossene Membran analog den serösen Häuten darstellt, obwohl elektronenmikroskopisch LANGER und HUTH (1960) zumindest stellenweise eine Basalmembran darstellen konnten.

5. Die Synovia

Die gelbliche, klare, fadenziehende Synovia enthält nach BAUER, ROPES und WAINE (1940) die gleiche Konzentration niedermolekularer organischer und anorganischer Substanzen wie das Blut (STECK 1948, KELENTEI und HIDVEGI 1954). Der Eiweißgehalt entspricht dem des Blutserums. Die Mucinmenge von 0,8% bewirkt gegenüber dem Blut einen osmotischen Sog von 250 mm Wasser. Das Mucin ist deshalb einer der Hauptfaktoren beim Wasseraustausch zwischen Blutbahn und Gelenkhöhle. Die Zuckerkonzentration liegt etwa 30% unter der des Blutes. Herkunft und Bildungsstätte der Synovia war bis in die neuere Zeit umstritten.

Auf Grund morphologischer und histochemischer Untersuchungen wird die Synovia heute als Dialysat des Blutes aufgefaßt, dem durch aktive Zelleistung der Synovialiszellen Mucin beigemischt wird. Eine Abhängigkeit der Synovialflüssigkeit in ihrer Zusammensetzung und dementsprechend ihrem pH-Wert vom Gefäßsystem geht aus den Arbeiten von REED (1947) u. Mitarb. hervor, die nach Sympathektomie und Reizung des N. femoralis eine Änderung des pH der Gelenkflüssigkeit beobachten konnten.

6. Die Gefäßversorgung der Gelenkkapsel

Vom Rete arteriosum articulare dringen schräg durch das Stratum fibrosum Arterien und Venen [Basalarterien und -venen nach HIDVEGI (1954)] und verzweigen sich im lockeren Stratum subsynoviale. Die von den Basalarterien entspringenden Arteriolen gehen entweder direkt in die Zotten über, werden zu einem Teil des Gefäßplexus der keine Zotten formt oder bilden das feine Netz der zweiten Schicht, des Stratum capillare. In die Basalvenen münden die aus den Zotten abführenden Venen, wobei die größeren die efferenten Venen von 2—5 Synovialzotten vereinen. Zur gleichen Zeit führen sie das Blut des Stratum capillare ab. Dieses stellt eine feine, parallel verlaufende Schicht nicht untereinander verzweigter kollagener Bündel dar, in die eine elastische Faserschicht eingelagert ist. Sie enthält einen zusammenhängenden Kapillarplexus und liegt zwischen dem Stratum villorum et plicarum und dem Stratum subsynoviale. Das Stratum villorum et plicarum, als innerste und eigentliche Zottenschicht, hat eine ihm eigene typische Gefäßanordnung.

Die Innervation der Gelenkgefäße. Die Innervation der Gelenkgefäße ist gleich derjenigen anderer Blutgefäße (STÖHR 1928, SUNDER-PLASMANN und DAUBENSPECK 1938). Nach DAUBENSPECK (1938) sollen afferente markhaltige und auch efferente marklose (postganglionär sympathische) Gefäßnerven zu unterscheiden sein. MILLEN (1948) gibt an, daß die sympathischen Fasern der A. femoralis nur bis zum distalen Teil dieses Gefäßes zu verfolgen sind, während nach GARDNER (1950) bei Schulter und Hüftgelenk des Menschen sympathische Fasern entlang der Gefäße bis in die Kapsel verlaufen sollen. Die Gefäße von Knie- und Ellbogengelenk erhalten nach GARDNER ihre autonome Nervenversorgung von sog. „Gelenknerven“. Die in der Gefäßadventitia der Gelenkgefäße beobachteten Nervenendigungen dienen offenbar dazu, auf Druck und Weite des Gefäßes anzusprechen und in den Durchblutungsmechanismus regulierend einzugreifen. Hitze und Kälte über dem Gelenk können reflektorisch die Gelenkinnentemperatur (HORVATH und HOLLANDER 1949) und die Durchblutungsgröße (COBBOLD und LEWIS 1956) beeinflussen. Nach COBBOLD und LEWIS erfolgt die sympathische Versorgung der Kniegelenkgefäße beim Hund aus Ästen des N. femoralis. Exstirpation des Grenzstranges L 4 bis L 6 hatte beim Hund nach den Ergebnissen von COBBOLD und LEWIS eine Steigerung des Blutdurchflusses durch die Gefäße des Kniegelenkes von 50% zur Folge. Adrenalin, Noradrenalin und Acetylcholin erzeugten bei den Gelenkgefäßen die gleichen Reaktionen wie an den Gefäßen des übrigen Körpers.

7. Das Lymphsystem des Stratum synoviale und der Gelenkkapsel

Ältere Autoren (SCHWEIGER-SEIDEL 1866, LUDWIG 1872) waren der Ansicht, daß die Gelenkkapsel keine Lymphbahnen besäße. BÖHM (1932) konnte jedoch 24 Std nach Injektion

eines Gemisches von Öl und Zinnober in Kniegelenke von Haustieren Zinnober in den regionären Lymphknoten nachweisen, indessen wie HAGEN-TORN (1882) keine Lymphgefäße finden. HUETER (1866) bewies die Existenz von Lymphbahnen. Durch eine besondere Injektionstechnik stellt TILLMANNS (1876) einen oberflächlichen und tiefen Lymphplexus dar, die beide miteinander in Verbindung stehen. Diese Befunde wurden von MAGNUS (1923), FISCHER (1933), KUHN (1933) und EFSKIND (1941, 1947) bestätigt. Von MOSENGEIL (1876) glaubte offene Verbindungen zwischen Lymphbahnen und Gelenkhöhle in Form von „Lymphstomata“ gefunden zu haben. Die Untersuchungen von BAUMECKER (1932, Injektion von Wasserstoffsuperoxyd) und SIGURDSON (1930, Eisenammoniumsulfat und Ferrocyanid) ergaben wie die Befunde EFSKINDS (1944, 1947) zwar eine Bestätigung der Ergebnisse TILLMANNS (1876), doch konnten keine offenen Verbindungen der Gelenkhöhle mit dem Lymphsystem gefunden werden. Während der stellenweise sehr dicht unter der innersten Synovialschicht gelegene Lymphplexus resorptive Funktionen erfüllen soll, diene der tiefer gelegene dem Abtransport (HIDVEGI 1954).

8. Die Schmerzempfindlichkeit der Gelenke

Während RASZEJA und BILLEWICZ-STANKIEWICZ (1934) feststellten, daß das Stratum synoviale direkt schmerzempfindlich ist, fand DAVIES (1950), daß die Synovialoberfläche weder auf Berührung noch auf Stechen mit einer Nadel schmerzempfindlich war. Zug an der Gelenkkapsel dagegen löste einen stechenden, allerdings schlecht lokalisierbaren Schmerz aus. In demselben Sinne sprechen die Angaben von LERICHE und BRUNDSCHWIG und JUNG (zit. nach GARDNER 1950), daß bei schweren Verrenkungen die intraartikuläre Injektion von Lokalanästhetica unwirksam waren, während periartikuläre Injektion den Schmerz zurückgehen ließ. Nach KELLGREEN (1939) ergeben unbeabsichtigte Injektionsstiche in den Knorpel von Patella oder Femur ein Druck- bzw. Berührungsgefühl, während Injektionen in den suprapatellaren Schleimbeutel Schmerzen im Gelenk erzeugen können, die nicht genau lokalisierbar sind. Gelenkschmerzen, gleich welcher Ursache, sind immer schwer und tief und können z. B. im Falle des Kniegelenkes bis in den Knöchel ausstrahlen. Sie sollen klinisch häufig mit Pulsabfall, Blutdruckabfall und Nausea verbunden sein (HOLLANDER und HORVATH 1953). Elektrische Reizung der Kniegelenkkapsel des Kaninchens erzeugte einen Abfall der Atemfrequenz und des Blutdruckes. Mechanisches Ziehen an Bändern bedingt sofortige Verlangsamung der Atmung und Anstieg des Blutdruckes (JAROSCHY 1925, RASZEJA und BILLEWICZ-STANKIEWICZ 1934). GARDNER (1950) fand bei starker elektrischer Reizung der Gelenknerven von Hunden (Narkose) Blutdruckabfall und wechselnde Beeinflussung der Atmung. Es ist bekannt, daß Gelenkschmerzen oft mit Muskelspasmen verbunden sind, die durch periartikuläre Novocaininjektionen herabgesetzt werden können. Demgegenüber stehen Befunde von ERGENBRIGHT und LOWRY (1944), die nach Injektion von Novocain in Gelenknerven Gelenkschmerzen auslösen konnten, die von 36 Std bis zu 3 Monaten anhielten.

II. Überlegungen bezüglich der Resorption von Flüssigkeiten aus Gelenken

Die Gelenkhöhle kann als ein Spalt im Bindegewebe aufgefaßt werden. Die der Gelenkhöhle zugewandte Schicht ist als ein Organ mit bestimmten, der Gelenkfunktion dienenden Aufgaben anzusehen. Der unterschiedliche Aufbau und die verschiedenartige Vaskularisation deuten auf bestimmte, streng auf die einzelnen Bereiche beschränkte Funktionen hin. Wenn auch über die Wirkungsweise dieser Bauelemente noch nichts Sicheres bekannt ist, so lassen sich doch aus Aufbau und Vaskularisation gerade in Hinsicht auf Sekretion und Resorption in Verbindung mit den an anderen Organen gewonnenen experimentellen Ergebnissen Schlüsse auf ihre Funktionsweise ziehen. Im Sinne einer Arbeitshypothese wurde von uns unterstellt, daß in den Zotten die Sekretion der Synovia (mucinfreies Blutfiltrat) und in den anderen „normal“ vaskularisierten Abschnitten die Resorption erfolge. Es ist jedoch fraglich, ob diese Hypothese experimentell bewiesen werden kann. Der Austausch von extrazellulärer Flüssigkeit an der Kapillarwand dürfte dem in anderen Körperregionen entsprechen. Jedoch ist bei Resorptionsversuchen am Gelenk nicht ohne weiteres der gleiche Mechanismus anzunehmen wie er nach Injektion von Flüssigkeit in das subkutane Gewebe angenommen wird. Während in das subkutane Gewebe injizierte Flüssigkeit direkt mit den Kapillaren in Be-

rührung kommen kann, liegen im Gelenk andere Verhältnisse vor. Den Kapillaren des Stratum synoviale sind eine oder mehrere Schichten Synovialiszellen bzw. an den Stellen, an denen eine Bedeckung mit Synovialiszellen fehlt und die Kapillaren „nackt“ in die Gelenkhöhle vorragen (HUETER 1866), eine Schicht Grundsubstanz vorgelagert. Eine in ein Gelenk injizierte Flüssigkeit muß also diese Schichten durchdringen, bevor sie von den Kapillaren oder vom Lymphsystem resorbiert werden kann. Durch Änderung der Zusammensetzung der Grundsubstanz bzw. des Aufbaues der Synovial „intima“, müßte die Resorption aus dem Gelenk beeinflussbar sein. Es können also die am Unterhautbindegewebe gewonnenen Befunde nicht absolut als Modell für die Resorptionsverhältnisse aus den Gelenken angesehen werden (EDLUND 1949). Betrachten wir kurz die bisher bekannten Resorptions- und Diffusionsverhältnisse am Unterhautbindegewebe.

Im normalen Bindegewebe erfolgt eine Bewegung von Flüssigkeit nicht in präformierten Räumen, sondern entlang den Bindegewebsfibrillen. Die Flüssigkeit wird in Form eines Filmes durch Oberflächenkräfte an der Faseroberfläche festgehalten (McMASTER 1938, 1939, 1946). Diese durch Farbstoffe nachweisbaren Filme können sich nicht frei bewegen. Sie sind so dünn, daß sie praktisch ein Bestandteil des Bindegewebes sind, und stellen somit keine freie Flüssigkeit im eigentlichen Sinne dar. McMASTER zeigt, daß Flüssigkeiten unter normalem atmosphärischem Druck unter Ausschluß eines direkten Einstromens in Blut oder Lymphgefäße in Kontakt mit Bindegewebe gebracht, intermittierend in das Gewebe einströmen. Bei einem Druck von über 4,5 cm H₂O wurde der Einstrom kontinuierlich. Er stieg nicht signifikant bis zu einem Druck von 8,5 cm H₂O, um von da an proportional dem angewandten Druck anzusteigen. McMASTER nannte diesen Punkt „Brechpunkt“. Aus diesen Befunden wurde der Schluß gezogen, daß oberhalb des Brechpunktes die interfibrillären Räume eröffnet worden seien und sich nunmehr freie Flüssigkeit im Gewebe befinde. Den bis zu einem Druck von 4,5 cm H₂O zu beobachtenden intermittierenden Einstrom von Flüssigkeit sahen CHAMBERS und ZWEIFACH (1937, 1940, 1944, 1946, 1947), als durch die normale Vasomotion bedingt an. EDLUND (1949) fand für das Stratum synoviale des lebenden und toten Kaninchens einen Brechpunkt von 9,5 cm Wasser. Die Befunde McMASTERS am Bindegewebe der Maus stimmen mit denen EDLUNDS am Stratum synoviale des Kaninchens weitgehend überein. Es kann hieraus gefolgert werden, daß für die Resorption intraartikulär injizierter Flüssigkeit dieselben Bedingungen gelten wie für die Resorption aus dem Unterhautbindegewebe, wenn man den Resorptionsvorgang vom Kapillarsystem selbst betrachtet. Der Vaskularisationstyp, der am ehesten dem des Unterhautbindegewebes entspricht, findet sich beim Stratum synoviale im Gebiet der Falten und Fettpolster.

Hinsichtlich des eigentlichen Flüssigkeitsaustausches an der Kapillarwand bestehen zwei Ansichten: 1. Die Theorie von STARLING (1895/96) und 2. die Theorie von CHAMBERS u. ZWEIFACH. STARLINGS Theorie basiert auf der Erkenntnis, daß aus dem arteriellen Schenkel einer Kapillare durch den von der Herzarbeit abhängigen Druck Blutflüssigkeit abgepreßt wird. Durch den Flüssigkeitsverlust nimmt der onkotische Druck des Blutes zu, so daß er im venösen Schenkel der Kapillare den des umgebenden Gewebes übersteigt. Es resultiert nunmehr ein Einstrom von Wasser aus dem Gewebe durch die Capillarwand in das Blut. Diese Vorstellung stellt auch heute noch die Grundlage unserer Anschauung über den Flüssigkeitsaustausch an der Capillarwand dar. Während STARLING annahm, daß Filtration und Resorption an ein und derselben Kapillare erfolge, stehen CHAMBERS u. ZWEIFACH auf dem Standpunkt, daß Filtration und Resorption an anatomisch differenten Kapillaren vor sich gehe.

Aus den „Stromkapillaren“ als direkter Verbindung zwischen Arteriolen und Venolen soll auf Grund ihres höheren hydrostatischen Druckes Flüssigkeit filtriert werden, während in den „Netzkapillaren“ resorbiert werde. Die Durchströmungsgeschwindigkeit dieser Netzkapillaren würde durch präkapilläre Sphinkteren geregelt. ILLIG (1955, 1957) konnte das Vorkommen dieses Aufbaues eines Kapillarnetzes und der Sphinkteren an verschiedenen Körperregionen beim Tier nachweisen. ILLIG betont jedoch, daß dieser Vaskularisationstyp keineswegs für alle Körperregionen zutrefte. Er stelle wahrscheinlich nur eine regionäre Besonderheit des Endstromnetzes dar.

Abgesehen von diesem unterschiedlichen Aufbau des Kapillarnetzes unterliegen Filtration und Resorption auch bei dem von ZWEIFACH dargestellten Kapillarsystem den gleichen hydrodynamisch-onkotischen Gesetzen wie sie von STARLING angenommen wurden.

Der hydrostatische Druck im Kapillarsystem in Abhängigkeit von Querschnitt und Rhythmusaktivität der terminalen Arteriolen ist also einer der Hauptfaktoren bei Filtration und Resorption. Jede Änderung des Querschnittes und Rhythmus der Arteriolen muß zu einer Änderung von Sekretion und Resorption führen.

Außer diesen Faktoren sind jedoch noch einige mechanische Momente zu beachten. McMASTER (1946) konnte am Bindegewebe der Maus und des Kaninchens eine intermittierende Resorption beobachten, die beim toten Tier nicht festzustellen war. Er erklärt diesen intermittierenden Einstrom von Flüssigkeit in das Gewebe durch das Pulsieren der Gefäße. Geht man von der Vorstellung einer Ausbreitung von Flüssigkeit im Gewebe entlang den Bindegewebsfibrillen aus, so ist die Möglichkeit gegeben, daß die Ausbreitung dieser Flüssigkeit durch Reiben oder Pressen der geformten Elemente gegeneinander (wie sie durch die dauernde Gefäßpulsation gegeben ist) begünstigt wird. McMASTER und PARSONS (1938, 1939) konnten zeigen, daß ein pulsierender Durchströmungsdruck die Ausbreitung und auch die Resorption von Farbstoffen am isolierten Kaninchenohr beschleunigt. Bei reaktiver und Reflexhyperämie war ein Ansteigen des intermittierenden Einstromes von Flüssigkeit in das Gewebe zu beobachten, solange kein Ödem bestand.

Der Austausch von Flüssigkeit an den Kapillaren des Stratum synoviale dürfte von den gleichen Faktoren abhängig sein. Der Nachweis eines Vasomotorenmechanismus im Sinne von ZWEIFACH (s. a. EDLUND) steht noch aus. Jedoch entspricht die Vaskularisation des Stratum synoviale bis auf einen, durch ihre Funktion (der Absonderung eines Teiles der Gelenkschmiere) bedingten unterschiedlichen Aufbau der Synovialzotten, weitgehend derjenigen anderer Körpergebiete. Es dürfen also hinsichtlich der Resorption aus dem Stratum synoviale dem Bindegewebe analoge Verhältnisse vermutet werden.

III. Experimenteller Teil

1. Methodik und Versuchsanordnung

In meinen Versuchen sollten unphysiologische Belastungen der Versuchstiere weitgehend vermieden werden. Weiterhin sollten (bei kleiner Injektionsmenge) direkte, unmittelbar auswertbare Meßwerte erhalten werden. Eine solche Möglichkeit war durch Anwendung radioaktiver Isotope gegeben. Als Testsubstanz wurde radioaktiver Phosphor (P^{32}) gebunden an KH_2PO_4 benutzt und zwar deshalb, weil mit ihm im Rahmen der zur Verfügung stehenden Möglichkeiten auf Grund seiner beschränkten Strahlungsreichweite und seiner Halbwertszeit von 14,3 Tagen relativ gefahrlos und ohne besondere Schutzmaßnahmen mit geringem technischem Aufwand gearbeitet werden konnte.

Als Versuchstiere dienten gesunde, nicht ausgewählte Kaninchen beiderlei Geschlechts (Gewicht 2000—3000 g), die unter normalen Futterbedingungen in Einzelställen gehalten wurden. Die Versuche wurden an den Kniegelenken durchgeführt. Die Injektionslösung (Testlösung) enthielt in 25 cm³ 0,85%iger Kochsalzlösung 83 mg $KH_2P^{32}O_4$ entsprechend einer Aktivität von 220 μC . Die leicht saure Lösung wurde durch Zugabe eines Phosphatpuffers auf ein pH von 7,2 eingestellt. Die jeweilige Injektionsmenge betrug 0,1—0,3 cm³ dieser Lösung. War die Aktivität der Testlösung bei einer Injektionsmenge von 0,3 cm³ soweit abgesunken, daß bei der Messung Ausgangswerte von weniger als 1000 Imp./min erhalten wurden, dann wurde der Rest der Lösung verworfen und neue Lösung angesetzt. Nach der intraartikulären Injektion wurde der Aktivitätsabfall der injizierten Lösung über dem Gelenk gemessen. Aus dem Abfall der Aktivität über dem Gelenk konnte auf die in der Zeiteinheit resorbierte Menge der Substanz geschlossen werden. Bei den geringen Injektionsmengen war mit einer intraartikulären Druckerhöhung über den Brechpunkt des Stratum synoviale auch bei versehentlicher Beugung des Gelenkes über 60° nicht zu rechnen. Jedoch erfolgten alle Messungen bei einem Beugewinkel des Kniegelenkes von 45°. Wenn ein Tier bei der Injektion Schmerzen äußerte, oder wenn bei einem Tier Zweifel hinsichtlich genauer intraartikulärer Injektion bestanden, wurde es vom Versuch ausgeschlossen.

Drei bis vier Tage vor dem Versuch wurden die Haare über dem zu untersuchenden Kniegelenk, meist jedoch über beiden Gelenken, entfernt. Dies konnte durch Abschneiden mit einer Schere geschehen. Es erwies sich jedoch als günstiger, die Haare mit einer käuflichen Enthaarungspaste zu entfernen. Dabei sind Hautverletzungen und Dermatitis zu vermeiden. Die Entfernung der Haare soll deshalb einige Tage vor dem Versuch vorgenommen werden, um auch das Tier an die Temperaturänderungen über der Gelenkregion zu gewöhnen,

und plötzliche Temperaturschwankungen an der Haut (die die Gelenkdurchblutung beeinflussen könnten) möglichst auszuschalten.

Durchführung des Versuches: Das Tier wird in Rückenlage auf einem Tieroperationstisch fixiert. Die anfangs oft heftigen Abwehrbewegungen lassen sich dadurch verhindern, daß man die Tiere durch „Training“ mehrere Tage vor dem Versuch in langsam sich steigenden Zeitintervallen an die Rückenlage gewöhnt. Erfahrungsgemäß liegen die Tiere dann über Stunden ruhig. Ein besonderes Fixieren des zu untersuchenden Gelenkes durch ein Gipsbett oder durch weiteres Anbinden führt zu Abwehrbewegungen und erschwert die Messung. Der Operationstisch wird mit einer Lage Zellstoff ausgelegt. Man erreicht damit eine bessere Lagerung und vermeidet, abgesehen von einer Verschmutzung des Tisches durch Exkremente, auch eine eventuelle Verunreinigung mit radioaktiver Substanz, die bei Abwehrbewegungen während der Injektion vorkommen kann. Auf Nackenspanne und Nasenring kann verzichtet werden, da sie für das Tier unbequem sind. Unter den Kopf des Tieres wird lediglich ein Zellstoffbausch gelegt. Das zu untersuchende Gelenk wird durch eine Zellstoffrolle gestützt, die Dicke der Rolle ist so zu wählen, daß die Gelenkbeugung etwa 45° beträgt (s. Abb. 1). Die intraartikuläre Injektion erfolgt mit einer Kanüle (18) bei halbgebeugtem Knie am oberen Rand der Patella durch die Patellarsehne. Vor der Injektion wird die Haut seitlich verschoben, damit der Stichkanal durch die zurückgleitende Haut verschlossen und ein eventuelles Austreten injizierter Substanz vermieden wird. Injiziert wird mit völlig trockener Kanüle, die vorher nicht mit der Testlösung in Berührung gekommen ist, um eine Verunreinigung der Haut und damit falsche Meßergebnisse zu vermeiden.

Nach Durchstechen von Haut und Sehne „fällt“ man mit der Kanüle in das Gelenklumen. Die Injektion erfolgt zwecks genauer Dosierung mit einer Tuberkulinspritze. Die nach der Injektion durch das Zurückgleiten der gespannten Haut an der Gelenkseite liegende Hauteinstichstelle wird mit einem feuchten Wattebausch gereinigt. Der obere Rand der Patella, entsprechend der Injektionsstelle an der Patellarsehne wird mit einem Punkt (Tusche, Kugelschreiber) markiert (s. Abb. 1). Über dem Gelenk wird mit Hilfe eines durchbohrten,

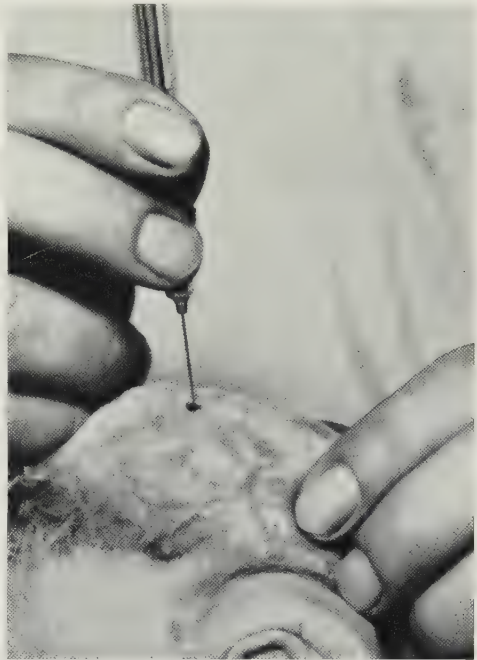


Abb. 1. Darstellung der Lagerung und Beugung des Kniegelenkes und der Injektionstechnik



Abb. 2. Darstellung des Befestigungsbrettes für das Zählrohr (mit Bohrloch, Befestigungsnägel für das Zählrohr und auf dem Film eingezeichnetem Fadenkreuz) in situ. (Die schrägen Schlitz wurden anfangs zur Fixierung der Extremität am Brett benutzt. Sie können weggelassen werden)

an der Unterseite mit einem Film abgedeckten Brettes ein Zählrohr so befestigt, daß die Markierungsstelle am Gelenk sich mit der Mitte des Zählrohres deckt. Druckstellen an der Haut der Kniegelenke lassen sich durch den Film erkennen und müssen vermieden werden (Abb. 2).

Die erste Messung erfolgt 1 min nach der intraartikulären Injektion der Testlösung. Die Meßzeit beträgt jeweils 1 min. Zwischen den einzelnen Messungen liegt eine Pause von 1 min. Der erste Meßwert hält sich bei den angegebenen Injektionsmengen zwischen 3000 bis 5000 Imp./min. Vor Beginn des Versuches wird unter den gleichen wie oben angeführten Bedingungen der Nullwert bei einer Meßzeit von 10 min bestimmt. Damit stellt man die bei einer zweiten oder dritten Injektion am gleichen Gelenk verbleibende Restaktivität fest und auch eventuelle Verunreinigungen des Brettes oder Operationstisches mit radioaktiver Substanz.

Bei der kurzen Strahlungsreichweite des radioaktiven Phosphors war zu erwarten, daß bei gleicher Injektionsmenge und bei gleicher Aktivität der injizierten Lösung je nach Dicke des Stratum synoviale, der Gelenkkapsel, des Unterhautfettgewebes und der Haut und der dadurch bedingten wechselnden Filterwirkung dieser zwischen strahlender Substanz und Zählrohr gelegenen Schichten von Tier zu Tier verschieden hohe Ausgangswerte bei der ersten Messung auftreten mußten. Desgleichen mußte der natürliche Abfall der Aktivität der Injektionslösung bei gleicher, in verschiedenem zeitlichem Abstand injizierter Menge, verschiedene Ausgangswerte ergeben. Um vergleichbare Werte zu gewinnen, wurde deshalb der prozentuale Abfall der Aktivität über dem Gelenk während des Versuches bestimmt, wobei der erste Meßwert, am Ende der zweiten Minute nach der intraartikulären Injektion der Testsubstanz gleich 100% gesetzt wurde.

2. Die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale des nicht vorbehandelten Kaninchens

a) Versuche mit verschiedenen Injektionsmengen. Im Grundversuch wurden neun gesunde Kaninchen verwandt. Bei vier Tieren (Gruppe 1) wurden jeweils $0,10 \text{ cm}^3$ der Testlösung entsprechend etwa $1 \mu\text{C}$ intraartikulär injiziert, während fünf Tieren (Gruppe 2) wechselnde Mengen (zwischen $0,165$ — $0,30 \text{ cm}^3$) injiziert wurden. Durch diese Versuche sollte geklärt werden, ob die Substanz aus der Gelenkhöhle abtransportiert wurde und wenn das der Fall war, wie sich wechselnde Injektionsmengen auf den Abtransport auswirkten.

Ergebnisse. Bei allen Tieren fand sich ein konstanter Abfall der Aktivität über dem Gelenk nach Injektion der radioaktiven Testlösung. Es zeigte sich,

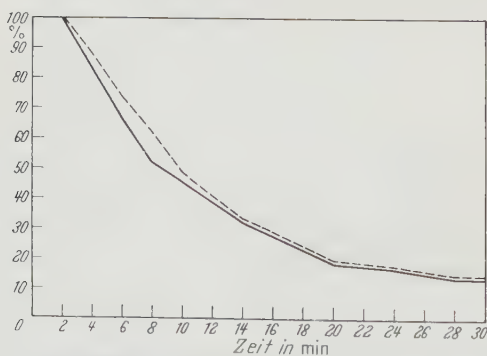


Abb. 3. Vergleich der Mittelwerte des prozentualen Abfalles der Aktivität über dem Gelenk der Gruppe 1 (Injektion von $0,10 \text{ cm}^3$) mit Gruppe 2 (Injektion von $0,165$ — $0,30 \text{ cm}^3$). ---- Gruppe 1, — Gruppe 2

daß innerhalb von 30 min die Aktivität von 100% auf durchschnittlich 14,4% abfiel. Der Abfall der Aktivität beginnt unmittelbar nach der Injektion (Abb. 3).

Von der 30. min nach der Injektion an bleiben die gemessenen Werte über Stunden fast konstant in gleicher Höhe bestehen. Außer einem etwas abweichenden Kurvenverlauf im Zeitraum 2.—10. min nach der Injektion (worauf später noch genauer eingegangen werden soll) finden sich keine signifikanten

Unterschiede zwischen den Injektionsmengen $0,10$ und $0,30 \text{ cm}^3$. Es konnten somit die Ergebnisse des ersten und zweiten Versuches zu einer Grundkurve zusammengefaßt werden, zumal damit zu rechnen war, daß im weiteren Verlauf der Versuche wegen des natür-

lichen Aktivitätsverlustes der radioaktiven Testlösung mit wechselnden Injektionsmengen gearbeitet werden mußte. Es wurde jedoch um eine Überdehnung der Kapsel, und damit reflektorisch Durchblutungsstörungen zu vermeiden bzw. den Brechpunkt nicht zu überschreiten, bei keinem Versuch mehr als $0,30 \text{ cm}^3$ Lösung injiziert.

Die Mittelwerte aus Versuchsgruppen 1 und 2 stellten die Grundwerte aller weiteren Untersuchungen dar.

b) Versuch am toten Tier. Obwohl auf Grund der bisherigen Ergebnisse und der sich daraus ergebenden Kurvenverläufe mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen war, daß die nach intraartikulärer Injektion der radioaktiven Substanz über dem Kniegelenk gemessene Abnahme der Aktivität auf einer echten Resorption der Lösung aus dem Gelenk beruhte, war der endgültige Beweis für eine Aufnahme der injizierten Substanz in das Blut noch zu erbringen. Insbesondere mußte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß die gemessene Abnahme der Aktivität auf einer Verteilung der injizierten Lösung in der Gelenkhöhle bzw. einer Diffusion in das periartikuläre Gewebe beruhte. Wenn am Abfall der Aktivität und dem damit gegebenen Kurvenverlauf Verteilungs- bzw. Diffusionsvorgänge beteiligt waren, dann war diese Methode zur Prüfung des Stratum synoviale nicht verwendbar.

Zur Klärung dieser Fragen wurden folgende Versuche durchgeführt:

Bei drei Kaninchen, die durch eine intravenöse Injektion von Evipan getötet worden waren, wurden sofort nach Herzstillstand $0,2 \text{ cm}^3$ der Testlösung in die Kniegelenke injiziert. Es wurden rechtes und linkes Kniegelenk benutzt, so daß insgesamt sechs Versuche durchgeführt wurden (Versuchsanordnung wie bei lebenden Tieren).

Die Ergebnisse sind in Abb. 4 wiedergegeben.

Es zeigte sich, daß im Gegensatz zu den Ergebnissen bei lebenden Tieren die Aktivität über dem Gelenk nicht abfiel, sondern anstieg.

Ein Ansteigen der Meßwerte ist normalerweise jedoch durch eine Zunahme der strahlenden Substanzmenge oder durch Verminderung filternder Schichten zwischen strahlender Substanz und Zählrohr bei gleichbleibender Substanzmenge bedingt. Bei unseren Versuchen blieb die injizierte Menge konstant.

Das Ansteigen der Meßwerte kann also nur so erklärt werden, daß nach der intraartikulären Injektion bei fehlender Resorption durch Blut- oder Lymphbahn eine Diffusion der Lösung aus den Gelenk in das Gewebe einsetzt. Durch Eindringen der Lösung in das Stratum synoviale und die Gelenkkapsel rückt die strahlende Substanz dem Zählrohr näher. Die Filterwirkung dieser Gewebsschichten fällt teilweise fort, die Aktivität nimmt scheinbar zu.

Diese Versuche zeigen eindeutig, daß der beim lebenden Tier nach intraartikulärer Injektion der radioaktiven Testlösung beobachtete meßbare Aktivitätsabfall auf der Fähigkeit des lebenden Synovialgewebes beruht, die intraartikulär applizierte Substanz abzutransportieren.

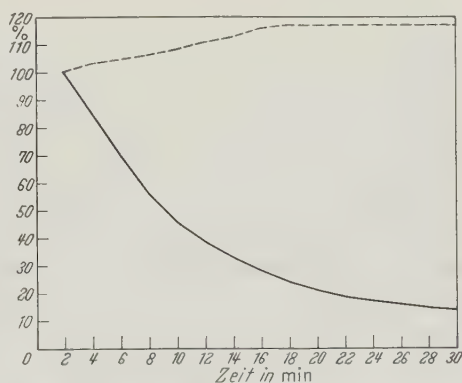


Abb. 4. Vergleich der Mittelwerte der bei toten Tieren über dem Gelenk gemessenen Aktivität mit denen bei lebenden Tieren. --- Tote Tiere, — lebende Tiere

c) Messung der Aufnahme intraartikulär injizierter Testlösung in die Blutbahn.

Schließlich war der endgültige Beweis dafür, daß es sich bei dem gemessenen Aktivitätsabfall um eine aktive Resorptionsleistung des Stratum synoviale handelte, noch zu erbringen. Ein durch Resorption bedingter Abfall der Aktivität im Gelenk mußte zu einer Zunahme der Aktivität im Blute des betreffenden Versuchstieres führen.

Bei vier Kaninchen wurde unter den oben angegebenen Versuchsbedingungen 0,2 cm³ der Testlösung jedoch mit einer jeweiligen Aktivität von 10 μ C intraartikulär injiziert. Nach der Injektion wurden im Abstand von 2 min aus der Ohrvene 0,1 cm³ Blut mit einer Blutzuckerpipette entnommen und die Aktivität des entnommenen Blutes im Flüssigkeitszählrohr gemessen. Die entnommene Blutmenge wurde mit destilliertem Wasser auf 11 cm³ verdünnt. Jede Blutprobe wurde 10 min lang gemessen. Die Tiere waren vorher noch nicht mit radioaktivem Material behandelt worden. Vor dem Versuche wurde die Aktivität des Normalblutes bestimmt und dieser Wert von den Meßergebnissen abgezogen.

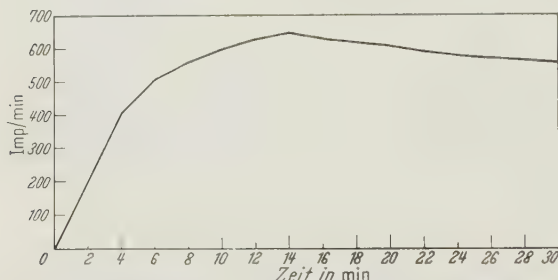


Abb. 5. Mittelwerte der Aktivitätszunahme im Blut nach intraartikulärer Injektion von 0,2 cm³ entsprechend 10 μ C. (Es wurden die direkt gemessenen Werte eingetragen)

In Abb. 5 sind die Mittelwerte der direkten Meßergebnisse dargestellt. Daraus geht eindeutig hervor, daß unmittelbar nach der Injektion der Lösung in das Gelenk die Aktivität des Blutes steil ansteigt, nach 14 min ihren Höhepunkt erreicht und dann langsam abfällt. Diese Ergebnisse sind als weiterer Beweis dafür anzusehen, daß die be-

obachtete Abnahme der Aktivität über dem Gelenk auf einer Resorption der intraartikulär injizierten Testlösung beruht. Die Tatsache, daß die Kurve der Aktivitätszunahme im Blut nach ihrem Gipfelpunkt langsam abfällt, spricht dafür, daß das resorbierte Material entweder renal ausgeschieden wird oder in das Gewebe abwandert. Die Versuche am Kniegelenk des toten Tieres in Verbindung mit der Aufnahme intraartikulär injizierter radioaktiver Kaliumphosphatlösung in das Blut bestätigen die Annahme, daß der über dem Gelenk mit der angegebenen Methode gemessene Abfall der Aktivität nach intraartikulärer Injektion einer radioaktiven Testlösung auf einem Resorptionsvorgang beruht. Mit dieser Methode war es erstmalig möglich, unter weitgehend physiologischen Bedingungen durch direkte Meßergebnisse die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale in zeitlichem Ablauf zu verfolgen.

d) Ergebnis der Versuche über die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale des nicht vorbehandelten Kaninchens. Aus den Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß ein normales Kaninchenkniegelenk in der Lage ist, eine wäßrige Lösung (im vorliegenden Falle radioaktives Kaliumphosphat) zu resorbieren. Welche Erkenntnisse vermitteln nun diese Ergebnisse hinsichtlich des Resorptionsablaufes?

Ein Vergleich der nach Injektion von 0,10 cm³ gewonnenen Kurven mit denen bei Injektion bis 0,30 cm³ läßt deutlich einen langsameren Abfall der Aktivität — auf die Resorption bezogen also eine geringere Resorption bei kleinen Injektionsmengen — in den ersten 10 min nach der Injektion erkennen.

Die Erklärung hierfür dürfte darin zu suchen sein, daß die geringe Injektionsmenge sich nicht sofort gleichmäßig über das ganze Gelenk verteilt, sondern sich von der Injektionsstelle in der Gelenkhöhle aus langsam mit der viskösen Synovia mischt und so anfänglich nicht gleichmäßig mit der gesamten resorbierenden Synovialoberfläche in Berührung kommt. Es resultiert ein langsamerer Abfall der Aktivität. Werden die Injektionsmengen jedoch größer, dann verringert sich dieser „Mischungsfehler“ dadurch, daß sofort größere Mengen des injizierten Materials mit dem Stratum synoviale in Berührung kommen und resorbiert werden können. Es wurde jedoch schon darauf hingewiesen, daß man gezwungen ist, während der Versuche wegen des natürlichen Aktivitätsverlustes der Testlösung mit wechselnden Mengen zu arbeiten. Daher wurden als Grundlage der vorliegenden Versuche die Mittelwerte der mit Injektionsmengen von 0,10—0,30 cm³ gewonnenen Ergebnisse gewählt. Aus Abb. 3 ist weiterhin ersichtlich, daß die Unterschiede bezüglich des Aktivitätsabfalles innerhalb der ersten 10 min sich im weiteren Verlauf der Kurven nicht auswirken. Beide Kurven verlaufen von der 12. min nach der Injektion an in geringem Abstand parallel. Dieser „Mischungsfehler“ kann beim Vergleich der Normalkurve mit den unter pathologischen Bedingungen gewonnenen Kurven vernachlässigt werden, zumal wenn man zur Errechnung der Signifikanz bzw. der Mittelwertsdifferenzen einen der folgenden Werte z. B. den Wert 20 min nach der Injektion als Berechnungsgrundlage für die zu vergleichenden Ergebnisse nimmt. Dieser Fehler gewinnt jedoch an Bedeutung und muß berücksichtigt werden, wenn man aus den Meßwerten die Resorptionsleistung des Stratum synoviale beim Normaltier bestimmen will.

Es ist ersichtlich, daß der erste, 2 min nach der intraartikulären Injektion gemessene Wert gleich 100% gesetzt wurde. Der eigentliche mit 100% anzusetzende Wert ist jedoch der Meßwert im Augenblick der Injektion. Dieser unbekannte Ausgangswert muß aus der Versuchskurve errechnet und die Kurve zur Bestimmung der wirklichen Resorptionsleistung auf diesen Ausgangswert umgerechnet werden. Man könnte nun zur Bestimmung des wirklichen Ausgangswertes die gewonnene Kurve bis zum Schnittpunkt mit der Koordinate verlängern. Dieser so gewonnene Wert würde jedoch auf Grund des erwähnten „Mischungsfehlers“ nicht dem wahren Ausgangswert entsprechen. Bei allen bisher wiedergegebenen Kurven fällt auf, daß der Abfall der Aktivität von Meßwert 1 zu 2 geringer ist als bei den nun folgenden Werten. Von Wert 4 min bis zum Wert 10 min nach der Injektion fällt die Kurve konstant, fast gradlinig, um dann wieder flacher zu werden. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Verhältniswerte der Messungen zueinander betrachtet. Es ergibt sich dann:

$$\text{Wert 2 min zu 4 min} = 1,180$$

$$\text{Wert 8 min zu 10 min} = 1,237$$

$$\text{Wert 4 min zu 6 min} = 1,225$$

$$\text{Wert 10 min zu 12 min} = 1,186$$

$$\text{Wert 6 min zu 8 min} = 1,234$$

$$\text{Wert 12 min zu 14 min} = 1,162$$

und weiter abfallend bei Wert 28 min zu 30 min = 1,04. Daraus ergibt sich eindeutig, daß vom Zeitpunkt der Injektion an bis zur 6. min weniger Substanz aus der Gelenkhöhle abtransportiert wird als von der 6. bis zu 10. min. (Das Kleinerwerden der Resorption von der 10. min an hat andere Gründe auf die später noch eingegangen werden soll.)

Wenn man von der theoretischen Annahme ausgeht, daß bei Injektion einer Lösung in ein Gelenk diese sich sofort gleichmäßig über die ganze Oberfläche des Stratum synoviale verteilen würde, dann wäre zu erwarten, daß in der Zeiteinheit, bei gleichbleibender resorbierender Oberfläche, die gleiche Menge der injizierten Substanz resorbiert würde. Das aber würde bedeuten, daß sich Wert 2:4 wie Wert 4:6, wie 6:8 usw. verhalten würde. Wir müssen deshalb bei der Berechnung der wirklichen Kurve von den Werten ausgehen, die der größten Wahrscheinlichkeit nach die wirkliche Resorptionsleistung bei angenähert idealer Verteilung der injizierten Substanz im Gelenk wiedergeben. Das würde aus Kurvenverlauf und

Verhältnswerten etwa der Zeit von 6—10 min nach der Injektion entsprechen, mit einem Verhältnswert von 1,235. Eine Korrektur des Anfangsteiles der Kurve mit diesem Verhältnswert ergibt dann (von Wert 6 min an gerechnet):

6 min nach der Injektion = 70,1% 2 min nach der Injektion = 106,9%
4 min nach der Injektion = 86,5% 0 min nach der Injektion = 132,0%

Somit wäre der wahre Ausgangswert mit 132,0% einzusetzen, während er bei einfacher Verlängerung der Kurve und Bestimmung des Schnittpunktes mit der Koordinate nur etwa 115% betragen würde (Abb. 6).

Zur Bestimmung der wirklichen Resorptionskurve muß dieser errechnete Ausgangswert von 132,0% gleich 100,0% gesetzt werden. Aus dem Verlauf dieser Kurve ist zu ersehen,

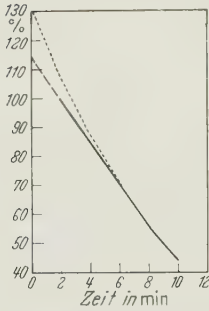


Abb. 6. Vergleich des Anfangsteiles der gemessenen mit der aus den Verhältnswerten errechneten Kurve.
— Gemessene Kurve,
.... errechnete Kurve

daß von der 10. min nach der Injektion an die Resorption scheinbar geringer wird. Bei der Korrektur des Anfangsteiles der Kurve gingen wir jedoch von der Voraussetzung aus, daß von einer resorbierenden Fläche in der Zeiteinheit die gleiche Menge Substanz aufgenommen werde. Wenn diese Voraussetzung zutreffen sollte, dann mußte die Resorptionsverlangsamung von der 10. min an durch Fehler in der Methode vorgetäuscht sein.

Betrachtet man die Kurve der Aufnahme intraartikulär injizierter radioaktiver Lösung in das Blut, dann fällt auf, daß die Aktivität des Blutes bis zur 10. min nach der Injektion steil ansteigt. Überträgt man diesen Befund auf die Methodik der Messung des Aktivitätsabfalles über dem Gelenk, dann kann die scheinbare Verzögerung der Resorption von der 10. min an zwanglos erklärt werden. 10 min nach der Injektion sind schon 65,3% der injizierten Substanzmenge resorbiert. Bei der Messung des Aktivitätsabfalles über dem Gelenk wird nun die durch die Resorption bedingte Zunahme der Aktivität des Blutes bei jedem Wert mitgemessen. Es überlagert sich nun die resorptionsbedingte Aktivitätsabnahme im Gelenk mit der Zunahme der Aktivität im Blute, so daß daraus die scheinbare Resorptionsverlangsamung entsteht. Abgesehen von der Aktivitäts-

zunahme des Blutes muß auch noch an eine gewisse Rücksekretion der zuvor aus dem Gelenk resorbierten Substanz bei einem gewissen Blutspiegel gedacht werden.

Tabelle. Endgültige Werte nach Korrektur des „Mischungsfehlers“ und der Überlagerung

Zeit nach der Injektion in min	Mittelwerte des prozentualen Abfalles der Aktivität
0	100,0
2	80,9
4	65,5
6	53,1
8	43,0
10	34,7
12	28,0
14	22,7
16	18,4
18	14,9
20	12,0
22	9,7
24	7,8
26	6,3
28	5,1
30	4,1

Es ist anzunehmen, daß die Resorption nach der 10. min dieselbe bleibt wie von der Injektion bis zur 10. min. Die unter diesen Gesichtspunkten mit der Verhältniszahl 1,235 korrigierten Meßwerte sind dann die in Tabelle und Abb. 7 wiedergegebenen.

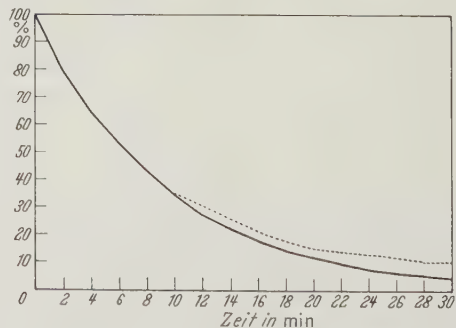


Abb. 7. Vergleich der gemessenen mit der korrigierten Kurve.
---- Gemessen, — korrigiert

Besprechung der Ergebnisse. Es zeigt sich, daß nach 30 min 95,9% der injizierten Substanz resorbiert sind. Infolge der schon bei den ersten Messungen

auftretenden Überlagerungen von Resorption und Zunahme der Aktivität im Blut (eventuell auch Rücksekretion der aufgenommenen Substanz aus dem Blut in das Gelenk) handelt es sich bei den angegebenen Werten nicht um Absolutwerte. Der durch die Überlagerung bedingte Fehler ist nicht zu erfassen und wurde bei der Bildung der Verhältniswerte in den ersten 10 min nicht berücksichtigt. Auch aus dem Vergleich der Aufnahme intraartikulär injizierter radioaktiver Lösung in das Blut (Abb. 3) mit den Werten einer Abnahme der Substanz nach Messung über dem Gelenk sind hinsichtlich der Resorptionszeit keine absoluten Schlüsse zu ziehen. Aus Abb. 5 ist deutlich zu ersehen, daß nach einem Gipfel 14 min nach der Injektion der Substanz in das Gelenk wieder ein Abfall der Aktivität des Blutes auftritt, der durch Ausscheidung der Substanz durch die Nieren oder auch durch Aufnahme in das Gewebe bedingt sein dürfte.

Es ist jedoch zu erwarten, daß diese Ausscheidung der resorbierten Substanz durch die Nieren oder ihre Abwanderung in das Gewebe schon unmittelbar bei einer Resorption von kleinen Mengen am Beginn eines Versuches einsetzt, so daß die Kurve des Anstieges der Aktivität im Blut zu geringe Werte wiedergibt.

Aus dem Vergleich der beiden Kurven dürfte mit einiger Wahrscheinlichkeit auf eine Resorptionsdauer von 20—25 min für intraartikulär injizierte wäßrige Lösungen beim Kniegelenk eines nicht vorbehandelten und nicht narkotisierten Kaninchens geschlossen werden.

Die einzigen mit einer direkten Methode erzielten, mit unseren Resultaten vergleichbaren Ergebnisse stammen von MOFFET (1954) und EFSKIND (1941). MOFFET bestimmte die Resorptionszeit für Diotrast am Kniegelenk der Ratte. Die Methodik unterscheidet sich weitgehend von der von uns angewandten und ergibt keinen Einblick in das Resorptionsgeschehen. Der Autor injizierte bei narkotisierten Ratten unter einem Druck von 85 cm Wasser Diotrast in die Gelenke und stellte an Hand von Röntgenaufnahmen die Zeit fest, die benötigt wurde, eine Injektionsmenge von $0,091 \text{ cm}^3$ zu resorbieren. 30 min nach der Injektion war kein Kontrastschatten mehr festzustellen. EFSKIND injizierte beim Kaninchen 1 cm^3 Perabrodil intraartikulär und stellte ebenfalls fest, daß nach 30 min kein Kontrastschatten mehr zu sehen war. Er setzt den Grenzwert der normalen Resorption um „sicher zu gehen“ mit 45 min fest und wertet alle darüber hinausgehenden Werte als pathologisch. In diesem Rahmen sind noch die Ergebnisse von SIGURDSON (1930) anzuführen, der 40 min nach Injektion von Eisenammoniumsulfat keine Farbstoffreaktion auf Ferrocyanid in der Gelenkhöhle mehr feststellen konnte. Die von den erwähnten Autoren angegebenen Werte von 30—45 min können auf Grund der angewandten relativ groben Untersuchungstechnik nur als angenähert genau angesehen werden. Bei dem von MOFFET angewandten hohen Injektionsdruck von 85 cm Wasser muß der Brechpunkt des Stratum synoviale weit überschritten worden sein, so daß physiologische Verhältnisse nicht mehr gewährleistet waren.

Wenn auch über den Brechpunkt des Stratum synoviale der Ratte nichts bekannt ist, so ist doch anzunehmen, daß er bei den Versuchen MOFFETS im Vergleich mit dem Stratum synoviale des Kaninchens mit 9,5 cm Wasser (EDLUND 1950) und dem Unterhautbindegewebe der Maus mit 8,5 cm Wasser (MCMASTER) überschritten wurde. Unter Berücksichtigung der Unterschiede in der von MOFFET, EFSKIND (1941), SIGURDSON angewandten und unserer eigenen Methodik glauben wir uns berechtigt, die von diesen Autoren angegebenen Werte bestätigend für die von uns festgestellte Resorptionszeit von 20—25 min heranziehen zu können. Jedenfalls dürfen die von SEIFTER u. Mitarb. (1949, 1950, 1952, 1954), PAUL (1952) und HIDALGO (1952) mit der Farbstoffmethodik indirekt bestimmte Resorptionszeit von 60 und mehr Minuten als zu hoch anzusehen sein und aus den angeführten Gründen der Methodik nicht zutreffen.

Unsere Ergebnisse zeigen in Bestätigung der Befunde von RHINELANDER u. Mitarb. (1939), daß die Resorption unmittelbar nach der intraartikulären Injektion einer wäßrigen Lösung beginnt. Zusammenfassend kann man sagen:

1. Die von uns angegebene Methode zur Messung der Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale berücksichtigt weitgehend die physiologischen Verhältnisse des Gelenkes.
2. Das Stratum synoviale des Kaninchens ist in der Lage, intraartikulär injiziertes radioaktives Kaliumphosphat zu resorbieren.
3. Die Resorption beginnt unmittelbar nach der intraartikulären Injektion und ist in einem Zeitraum von 20–25 min beendet.
4. Die Methode gestattet einen Einblick in den zeitlichen Ablauf der Resorption und kann zur Prüfung der Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale unter pathologischen Bedingungen angewandt werden.

3. Versuche zur Klärung der hämatogenen oder lymphogenen Resorption aus der Gelenkhöhle

Die ersten Prüfungen der Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale gingen von dem Gedanken aus, daß von der Gelenkhöhle her offene Verbindungen zum Lymphsystem bestehen, so daß in ein Gelenk injiziertes Material ausschließlich auf dem Lymphwege abtransportiert werden könne. Während sich jedoch trotz Anwendung verschiedener Methoden vom Gelenk her keine Lymphspalten darstellen ließen (BÖHM 1868, RIEDEL 1880, TILLMANN 1876, HAGEN-TORN 1882, BRAUN 1894), konnte man von der Gelenkkapsel her durch Injektion von Farbstoffen bzw. Tuschesuspensionen einen reich verzweigten Lymphplexus darstellen, der bis unter die innere Synovialiszellschicht zu verfolgen war. Die Untersuchungsergebnisse der erwähnten Autoren zeigen eindeutig, daß injizierte Farbstoffe bzw. Tusche aus dem Gelenk resorbiert wurden; der Mechanismus dieser Resorption jedoch war durch das Fehlen offener Verbindungen zum Lymphsystem völlig unklar. Als erster vertrat BRAUN (1894) die Ansicht, daß der Abtransport des injizierten Materials über den Umweg einer Diffusion von Farbstoffteilchen oder Tuschepartikeln durch die inneren Schichten des Stratum synoviale vor sich gehe. Kleinere Partikel sollten durch die Synovial „intima“ diffundieren und Lymphogen abtransportiert werden. Größere Partikel dagegen würden zuerst von Synovialiszellen phagozytiert und dann auf dem Lymphwege abtransportiert.

Die Ergebnisse von KROH (1908) und MAYEDA (1919/20) bestätigten zumindest für Tusche die Ansicht. HILDEBRANDT dagegen zieht erstmalig neben der lymphogenen Resorption unter Hinweis auf die außerordentlich gute Nervenversorgung der Gelenkgefäße „bis zu den Kapillaren“ einen Abtransport injizierten Materials auf dem Blutwege in Betracht. Ausgangspunkt seiner Überlegungen waren Befunde bei traumatischen Gelenkergüssen, bei denen es durch eine nerval bedingte Hyperämie zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Kapillaren kommen solle. Der so entstandene Gelenkerguß stelle vielleicht einen Schutz gegen den auslösenden Reiz dar. Bei der „bekannt schlechten Resorption“ aus den Gelenken sei es Aufgabe der Therapie, die abnorme Reizbarkeit der Synovialgefäße, die zum Erguß führe, abzustumpfen.

Den Einfluß der Nervenfunktion auf die Resorption aus der Gelenkhöhle versuchte HOFFHEINZ (1931) zu klären. Unter der Voraussetzung, daß es unmöglich ist, den Resorptionsablauf ohne Einschaltung wesentlicher Fehlerquellen wie Allgemeinnarkose, Morphiuminjektionen usw. zu verfolgen, injizierte er 20%iges NaJ in die Gelenke von Hunden und bestimmte das Einsetzen der Jodausscheidung im Speichel. Eine Durchschneidung des N. femoralis und ischiadicus führte zu einer verzögerten Ausscheidung des injizierten Jods. Injektionen mit Novocain und Adrenalinzusatz in die Gelenke ergab eine Hemmung der Resorption zwischen 40–100%, während Novocain allein unter Ausschaltung sensibler Nervenendigungen zu einer Verzögerung der Resorption von 22–39% führte. Damit war zumindest eine Beteiligung des Gefäßsystems an der Resorption in das Gelenk injizierter Stoffe sehr wahrscheinlich gemacht. BAUER, SHORT, BENNET (1933) und RHINELANDER (1939) zeigten, daß hochmolekulare Stoffe von der Größe der Proteine auf dem Lymphweg abtransportiert werden, wobei eine passive Bewegung des Gelenkes den Abtransport beschleunigte, wie schon die Untersuchungen von v. MOSENCEIL zeigten. Der Nachweis wurde dadurch erbracht, daß bei Katzen der Ductus thoracicus unterbunden wurde und nach Injektion blutdruckwirksamer Mittel in die Kniegelenke die im Ductus thoracicus angesammelte Lymphe in 15 min-Portionen gesammelt und anderen Katzen injiziert wurde. Von neun Versuchen zeigten nur zwei einen nachweisbaren Blutdruckeffekt. Damit war erwiesen, daß eine wäßrige

Lösung eines blutdruckwirksamen Mittels, daß nach Injektion in ein Gelenk schon in kürzester Zeit (30—60 sec) eine Wirkung auf den Blutdruck zeigte, nur in sehr geringen Mengen lymphogen resorbiert wurde. Ein weiterer Beweis für den hämatogenen Abtransport echter Lösungen ist die Tatsache, daß der nach der Injektion des blutdruckwirksamen Mittels prompt auftretende Blutdruckabfall durch anschließende Injektion von Adrenalin (1:1000) in die gleichen Gelenke weitgehend kompensiert werden konnte. Dementsprechend mußte auch Adrenalin hämatogen resorbiert werden. Injizierte man jedoch Adrenalin vor der Testsubstanz, dann hatte diese keine Wirkung auf den Blutdruck. Die Autoren erklären diese Ergebnisse damit, daß das blutdrucksenkende Mittel (Mecholyl) nach der Injektion in die Gelenke die subsynovialen Kapillaren erweiterte und somit eine Resorption des später injizierten Adrenalins ermögliche, während umgekehrt das zuerst injizierte Adrenalin die subsynovialen Gefäße zur Kontraktion bringe und die Resorption des später injizierten Mecholyl verhindere.

In vorliegender Studie habe ich versucht, einer Klärung der Frage: lymphogener oder hämatogener Abtransport wäßriger Lösungen dadurch näher zu kommen, indem ich Adrenalin unter verschiedenen Bedingungen anwandte.

a) Die Resorption aus dem Kniegelenk nach Injektion von Adrenalin. Bei drei Kaninchen wurde Adrenalin verschiedener Konzentration (bei zwei Tieren $0,2 \text{ cm}^3$ einer Lösung 10^{-6} und $0,3 \text{ cm}^3 10^{-8}$) zusammen mit der Testlösung in die Kniegelenke injiziert. Dieser Versuchsanordnung lag folgender Gedankengang zugrunde:

Wenn die Testlösung hämatogen abtransportiert wurde, war zu erwarten, daß der Abtransport bei Injektion von Adrenalin und dem durch das Mittel erzeugten Gefäßspasmus je nach Dosierung unterbunden oder mehr oder weniger stark vermindert wurde. Erfolgte der Abtransport dagegen lymphogen, dann mußte das injizierte Material gleich schnell wie beim Normaltier resorbiert werden. Zwar war von vorneherein eine völlige Klärung dieser Frage nicht zu erwarten, da durch die Adrenalinwirkung auch die Bildung der Lymphe aus den Gefäßen, damit der Lymphfluß und somit auch der Abtransport injizierten Materials, beeinflußt werden mußte.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 8 wiedergegeben: Nach der Injektion der mit Adrenalin gemischten Testlösung wird das injizierte Material

bedeutend langsamer abtransportiert. Bei Anwendung von Adrenalin in einer Dosierung von $0,2 \times 10^{-6}$ erfolgt in den ersten 12 min keine Resorption der injizierten Substanz aus dem Gelenk. Im Gegenteil tritt ein Anstieg der Aktivität auf, wie wir es schon beim toten Tier sahen, der mit einer Diffusion des radioaktiven Materials in dem Zählrohr nähergelegene Gewebsschichten zu erklären ist. Erst von der 12. min nach der intraartikulären Injektion an ist ein geringer Effekt zu beobachten, der — mit den Ergebnissen beim Normaltier verglichen — einer völligen Resorp-

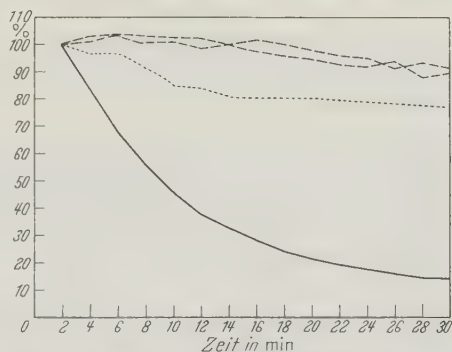


Abb. 8. Abfall der Aktivität über dem Gelenk nach Injektion von Adrenalin $0,2 \times 10^{-6}$ (---) und $0,3 \times 10^{-8}$ (····) im Vergleich zur nicht korrigierten Normalkurve

tionssperre entspricht. Injektion von Adrenalin in einer Dosierung von $0,3 \times 10^{-8}$ führte zu einer erheblichen Verlangsamung der Resorption. Während beim Normaltier die Aktivität der injizierten Lösung nach 20 min auf 20,5% des Wertes der ersten Messung abgesunken war, fanden sich bei gleichzeitiger Injektion von Adrenalin $0,2 \times 10^{-6}$ nach 20 min noch 98% bzw. 96% und bei Adrenalin $0,3 \times 10^{-8}$ noch 81% der injizierten Lösung im Gelenk.

Diese Ergebnisse legten es nahe, auch die Wirkung intravenös injizierten Adrenalins auf die Resorption aus dem Gelenk zu untersuchen. Wenn die injizierte Testlösung hämatogen abtransportiert wurde, war zu erwarten, daß unmittelbar nach der intravenösen Adrenalininjektion eine Beeinflussung der Resorption nach der einen oder anderen Richtung auftreten mußte, d. h. je nach Dosierung des Adrenalins und des davon abhängigen Gefäßtonus mußten bei einer Resorptionsbeschleunigung die Meßwerte über dem Gelenk schneller abfallen oder sie mußten bei einem Gefäßspasmus und dementsprechender Verzögerung der Resorption langsamer abfallen.

b) Die Resorption aus dem Kniegelenk nach intravenöser Injektion von Adrenalin. Bei vier Kaninchen wurde nach anfänglich normalem Abfall der Aktivität (also normaler Resorption der intraartikulär injizierten Testlösung) zu verschiedenen Zeiten der Testperiode Adrenalin intravenös injiziert. Es wurden verabfolgt: In zwei Versuchen Adrenalin $1,0 \times 10^{-4}$ und in je einem Versuch $1,0 \times 10^{-5}$ und $0,5 \times 10^{-5}$ cm³.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Abb. 9. Fast unmittelbar nach der Injektion des Adrenalins weichen die Resorptionskurven von ihrem ursprünglichen

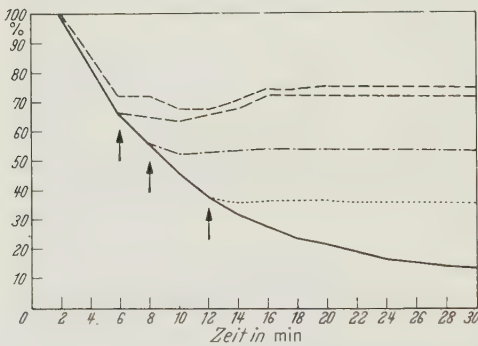


Abb. 9. Abfall der Aktivität über dem Gelenk nach intravenöser Injektion von Adrenalin im Vergleich zur Normalkurve. (--- Adrenalin $1,0 \times 10^{-4}$, - · - - $1,0 \times 10^{-5}$, · · · · $0,5 \times 10^{-5}$)

Verlauf ab. Die Meßwerte bleiben konstant bzw. steigen geringgradig an. Das bedeutet hinsichtlich der Resorption der Testlösung eine völlige Resorptionssperre. Auch hier tritt wieder wie beim toten Tier und nach Adrenalinapplikation in die Gelenkhöhle ein Ansteigen der Meßwerte auf, um so deutlicher, je mehr Substanz noch im Gelenk vorhanden ist. Hiermit erhält die Annahme, daß es sich bei diesem Vorgang um eine Diffusion der injizierten Testlösung in dem Zählrohr nähere Gewebsschichten bei

völliger Sperre der Abtransporte handele, eine weitere Stütze. Aus den Kurven ist deutlich zu ersehen, daß die Diffusion größer ist, je mehr Substanz noch bei der adrenalinbedingten Gefäßsperre im Gelenk liegen geblieben ist und dementsprechend auch diffundieren kann.

Bei allen diesen vier Versuchstieren wurden bis 60 min nach der Injektion der Testlösung Messungen in minütlichem Abstand vorgenommen. Dabei fand sich, daß bei allen Tieren noch nach 60 min eine völlige Sperre des Abtransportes bestand, Tier 1, das $1,0 \times 10^{-4}$ cm³ Adrenalin erhalten hatte, starb 70 min nach der Adrenalininjektion. Die Obduktion ergab außer einer erheblichen Dilatation beider Herzkammern keinen Befund; die anderen drei Tiere überlebten.

c) Ergebnisse. Die Versuchsergebnisse zeigen eindeutig, daß unmittelbar nach der Injektion des Adrenalins, gleichgültig ob direkt mit der Testlösung in das Gelenk oder nach der Testinjektion intravenös gegeben, eine völlige Sperre der Resorption auftritt. Dieser Befund dürfte in Übereinstimmung mit HOFFHEINZ und RHINELANDER u. Mitarb. (1939) auf einen durch das Adrenalin bedingten Gefäßspasmus der Synovialgefäße zurückzuführen sein. Die Unter-

suchungen von COBBOLD und LEWIS (1956) bestätigen diese Vermutung. Die Autoren fanden bei direkter Messung des Blutdurchflusses am Kniegelenk des Hundes eine Verminderung des Blutdurchflusses nach intraarterieller Applikation von Adrenalin und Noradrenalin.

Welche Schlüsse können aus diesen Versuchsergebnissen hinsichtlich des eigentlichen Resorptionsvorganges gezogen werden? Die Versuche am Kniegelenk des toten Kaninchens zeigen, daß unmittelbar nach der Injektion der Testlösung eine Diffusion der Lösung in das Synovialgewebe einsetzt. Hiermit wird die von BRAUN (1894) angenommene primäre Diffusion intraartikulär injizierter Lösungen in das Synovialgewebe bestätigt. Wie der Kurvenverlauf zeigt, erfolgt beim Normaltier nach der Diffusion der Lösung durch die gefäßfreie innere Synovialiszellschicht sofort der Abtransport der diffundierten Substanz, auf Grund unserer Ergebnisse, in Verbindung mit den Befunden von HOFFHEINZ und RHINELANDER u. Mitarb. (1939) bei wäßrigen Lösungen hämatogen. Es ist nun anzunehmen, daß bei einer Sperre des hämatogenen Abtransportes durch Adrenalin und, wie die Kurven zeigen, fortschreitender Diffusion in das Synovialgewebe, ein besserer Kontakt der injizierten Lösung mit den Lymphbahnen gegeben ist. Das würde bedeuten, daß nunmehr, bei fehlender Resorption durch die Blutbahn ein vermehrter lymphogener Abtransport erfolgen müßte. Nach dem Kurvenverlauf ist das offensichtlich nicht der Fall. Es ist jedoch nicht zulässig, hieraus einen lymphogenen Abtransport der Substanz auszuschließen. Auch ist noch zu bedenken, daß durch den Gefäßspasmus bzw. die stark verminderte Durchblutung des Stratum synoviale nach Adrenalinanwendung die Bildung von Lymphe aus den Gefäßen gestört ist. Wenn keine oder weniger Lymphe gebildet wird, kann trotz Diffusion der Testsubstanz in tiefere Gewebsschichten und besserer Kontaktmöglichkeit zu den Lymphbahnen keine Substanz abtransportiert werden.

Wenn auch die Klärung der Frage hämatogener oder lymphogener Abtransport wäßriger Lösungen aus dem Gelenk mit dieser Methodik nicht völlig geklärt werden kann, so zeigen doch die Versuche mit intravenöser Adrenalininjektion eindeutig, daß es mit der angegebenen Methode erstmalig möglich ist, unter weitgehend physiologischen Versuchsbedingungen einen direkten Einblick in den Ablauf der Resorption aus der Gelenkhöhle zu gewinnen; man ist nicht gezwungen, aus der Ausscheidungsrate anderer Körperorgane für intraartikulär injizierte Farbstoffe oder Lösungen auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale Schlüsse zu ziehen.

Versuche mit höheren Verdünnungen (Adrenalin $1,0 \times 10^{-12}$), intravenös und örtlich zusammen mit der Testlösung angewandt, führten zu keinen Ergebnissen. Nur bei einem Tier konnte nach Injektion von $0,2 \times 10^{-11}$ zusammen mit der Testlösung eine Beschleunigung der Resorption beobachtet werden. Die Aktivität war nach 20 min auf 10,5% gegenüber 20,5% beim Normaltier abgefallen.

4. Der Einfluß einer Dermatitis über dem Gelenk auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale

Für die Gefäße des Stratum synoviale wird nach STÖHR (1928), SUNDER-PLOSSMANN und DAUBENSPECK (1938) eine gleiche Innervation angenommen wie für andere Körpergefäße. Die Kontrolle der Gelenkgefäße unterliegt demnach den gleichen, durch das vegetative Nervensystem und seine Ausgangslage gegebenen Bedingungen. Die Befunde RÜDIGERS (1857),

denen zufolge die Gelenke von direkten oder indirekten Ästen derjenigen Nerven versorgt werden, die sich an der Innervation der über dem Gelenk liegenden Haut beteiligen, in Zusammenhang mit den Befunden von HOLLANDER und HORVATH (1953) über eine Beeinflussung der Gelenkinnentemperatur durch Applikation von Kälte oder Hitze über dem Gelenk, können im Sinne einer Beeinflussung der Gelenkgefäße durch Hautreize, über einen allerdings hypothetischen Axonreflex, gedeutet werden.

COBBOLD und LEWIS (1956) konnten beim Hund nach Durchschneiden des Gelenkastes des N. femoralis der sympathische Fasern enthält, eine Erhöhung des Blutdurchflusses durch die Gelenkgefäße um annähernd 50 % feststellen, während eine Reizung des durchschnittenen Nervenendes zu einer Vasokonstriktion führte. Eine Durchschneidung des Nerven in Höhe von L 4 erzeugte einen merklich gesteigerten venösen Ausfluß, während eine Entfernung des sympathischen Ganglions den Durchfluß fast verdoppelte. Innerhalb 1 Std jedoch hatte sich der Blutdurchfluß wieder auf den normalen Spiegel gesenkt. Während eine Senkung des allgemeinen Blutdruckes keine Verminderung des Blutdurchflusses durch das Gelenk erkennen ließ, war nach Sympathektomie und allgemeiner Blutdrucksenkung durch einen Aderlaß immer ein erhöhter Blutdurchfluß festzustellen. Auf Grund dieser Befunde in Verbindung mit den nach Anwendung von Adrenalin, Noradrenalin und Acetylcholin gewonnenen Resultaten, kamen diese Autoren zu dem Schluß, daß der Grundtonus der Gelenkgefäße durch den Sympathikus bestimmt würde. COBBOLD und LEWIS (1956) wiesen weiterhin nach, daß die Gelenkdurchblutung durch Kälte oder Hitzeanwendung über dem Gelenk maßgeblich zu beeinflussen war.

Der Einfluß einer Hautreizung auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale wurde bisher nur von SEIFTER u. Mitarb. (1949, 1952) untersucht. Die Autoren stellten fest, daß in die Talocruralgelenke von Kaninchen injiziertes Phenolsulfonphthalein bei gleichzeitig über dem Gelenk induzierter Dermatitis renal verzögert ausgeschieden wurde.

Wir benutzten vier Kaninchen, bei denen es durch zu lange Einwirkung eines Enthaarungsmittels über dem Gelenk zu einer Dermatitis gekommen war.

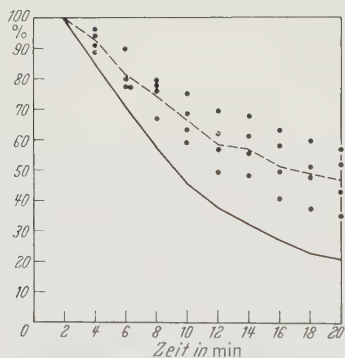


Abb. 10. Vergleich der Normalkurve mit den bei Dermatitis gewonnenen Werten. — Normalkurve, ---- Mittelwert der Versuchsgruppe, die Punkte stellen die einzelnen Meßwerte der Versuchsgruppe dar

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 10 wiedergegeben. Sie zeigt, daß die Resorption der injizierten Testlösung aus dem Gelenk während der Dermatitis bei allen Tieren verzögert war. Während beim Normaltier 20 min nach der Injektion der Testlösung die Aktivität über dem Gelenk im Mittel auf $20,5 \pm 3,2\%$ abgefallen war, ergab sich bei Tieren mit Dermatitis ein Mittelwert von $46,5 \pm 10,5\%$. Die große Streubreite der Werte innerhalb der Versuchsgruppe dürfte durch verschiedenen stark ausgeprägte Entzündungserscheinungen von Tier zu Tier bedingt sein, wobei jedoch noch an eine je nach Tier verschiedene Reflexbereitschaft zu denken ist. Die Mittelwerte unterscheiden sich voneinander bei einem P von kleiner als 0,001 signifikant.

Es war nunmehr festzustellen, ob mit dem Abklingen der Hauterscheinungen auch die Resorption aus der Gelenkhöhle sich wieder normalisierte. Wir untersuchten deshalb die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale in verschiedenen Stadien der Dermatitis und nach deren Abheilung bei insgesamt sechs Tieren. Wir führen zwei Beispiele an:

Tier 9. Am 26. 6. wurden mit einer Enthaarungspaste die Haare über dem Kniegelenk rechts entfernt. Am 27. 6. bestand eine geringe Hautrötung an der behandelten Stelle. Das Tier wurde vom Versuch ausgeschlossen. Einen Tag später war die Haut stark gerötet,

ödematös verdickt, an einzelnen Stellen mit gelben Borken bedeckt. Die Resorption war in diesem Stadium der Dermatitis erheblich verzögert (s. Abb. 11). Am 29. 6. war derselbe Hautbefund festzustellen. Die Resorptionsverhältnisse sind, wie aus Abb. 11 ersichtlich, die gleichen wie am Vortag. Zehn Tage später war die Dermatitis abgeheilt. Ein nunmehr durchgeführter Versuch (9. 7.) zeigte völlig normale Resorptionsverhältnisse (Abb. 11).

Tier 12. Enthaarung auf die übliche Art am 6. 7. Am 8. 7. Dermatitis mit Rötung, Ödem und Borkenbildung. Die Resorption ist (Abb. 12) stark verzögert. Am 9. 7. bei gleichem Hautbefund eine geringe Resorptionsbeschleunigung gegenüber dem Vortage jedoch immer noch erheblich gegenüber der Norm verzögert. Am 12. 7. nach Abklingen der akuten Erscheinungen, aber bei noch geringer Hautrötung ist noch eine geringe Resorptionsverzögerung zu beobachten, die aber am 15. 7. nach Abklingen aller Hauterscheinungen nicht mehr zu

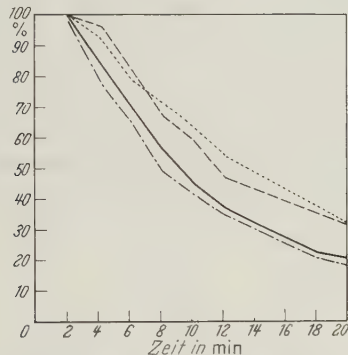


Abb. 11. Die Resorptionsverhältnisse am Gelenk bei Dermatitis und nach deren Abheilung im Vergleich zur Normkurve. — Normalkurve, ---- Dermatitis am 28. 6., am 29. 6., -.-.- nach Abheilung am 9. 7.

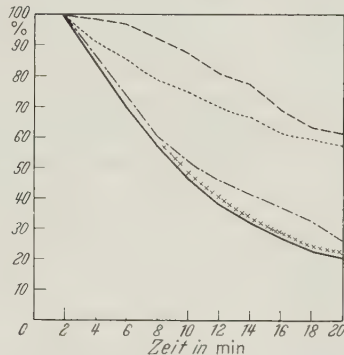


Abb. 12. Tier 12. Vergleich der Resorptionskurven in verschiedenen Stadien der Dermatitis mit der Normkurve. — Normal, ---- 8. 7., 9. 7., -.-.- 12. 7., +++ 15. 7.

beobachten ist. Bei vier von sechs Tieren dieser Gruppe normalisierte sich die Resorption mit dem Abklingen der Dermatitis. Bei zwei Tieren jedoch war die Resorption auch nach Abheilung der Hauterscheinungen noch nach 14 Tagen geringgradig gegenüber der Norm verzögert.

Diese Befunde zeigen, daß ein Reiz (hier eine Entzündung), der auf die Haut über dem Gelenk einwirkt, die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale maßgeblich beeinflussen kann. Es kann geschlossen werden, daß eine Reizung sensibler Hautnerven über einem Gelenk, in Bestätigung der Befunde von HOLLANDER und HORVATH (1953) und von COBBOLD und LEWIS (1953) reflektorisch den Gefäßtonus und die Durchblutungsgröße verändern kann. Weiterhin kann die von SEIFTER u. Mitarb. (1947, 1952) an Hand der indirekten Farbstoffmethode festgestellte Resorptionsverzögerung bei Hautreizen über dem Gelenk durch direkte Messungen bestätigt werden. Mit der von uns angegebenen Methode war es erstmals möglich, die reflektorischen Auswirkungen eines Hautreizes über dem Gelenk auf die Gefäße des Stratum synoviale in verschiedenen Stadien der Hautentzündung und damit verschiedener Reizintensität darzustellen. Je nach Intensität des Hautreizes, beurteilt nach dem makroskopischen Bild der Dermatitis, ändern sich die Resorptionsverhältnisse im Gelenk und zwar derart, daß eine um so stärkere Resorptionsverzögerung auftritt, je intensiver die Entzündung der Haut und damit die Reizintensität ist. Läßt die Dermatitis und damit der Hautreiz nach, normalisiert sich die Resorption und es ist anzunehmen, daß sich auch die Durchblutungsverhältnisse normalisieren. Es wäre verfehlt,

aus diesen Ergebnissen Rückschlüsse auf die Therapie ziehen zu wollen. Bei einem wodurch auch immer pathologisch veränderten Gelenk sind die Durchblutungsverhältnisse und der Gefäßtonus durch den auslösenden Prozeß verändert. Über die reflektorische Beeinflussung solcher in Tonus und Reaktionslage veränderter Gefäße durch einen Hautreiz über dem Gelenk kann nichts gesagt werden.

5. Der Einfluß der Barbituratnarkose (*Veronalnatrium*, *Evipannatrium*) und des Muskelrelaxans MY 301 (*Guajakolglycerinäther*) auf die Resorption

Zu Beginn der Untersuchungen habe ich wie andere Autoren, die sich mit der Resorption aus Gelenken von Tieren befaßten (SEIFTER 1949, 1952; MOFFET 1954; EDLUND 1949; HIDALGO 1952 u. a.), zur Ruhigstellung der Tiere während der Versuche in Allgemeinnarkose gearbeitet. Eine etwaige Wirkung der Narkose auf die Resorption wurde anfänglich auch deshalb vernachlässigt, weil von keinem der erwähnten Autoren ein Einfluß der Narkose auf die Resorption erwähnt wurde. Da das von SEIFTER (1949, 1952) verwandte Nembutal (Pento-

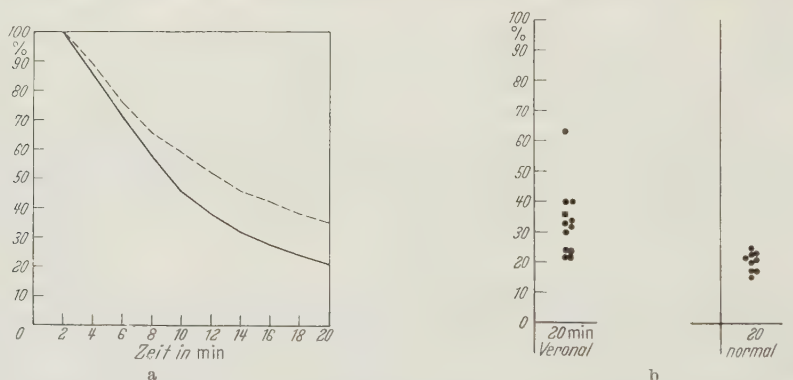


Abb. 13. a Vergleich der Mittelwerte narkotisierter (Veronal) Tiere mit der Normalkurve. — Narkose. b Vergleich der 20 min-Werte bei Narkose und ohne Narkose

barbitalnatrium) nicht zugänglich war, wurden Veronal und Evipannatrium in einer Dosierung von 0,05 g/kg Körpergewicht in einer 10%igen Lösung intravenös gegeben.

Im Verlauf der Versuche wurde jedoch festgestellt, daß die Resorption der Testlösung aus dem Gelenk narkotisierter Tiere so großen Schwankungen unterlag, daß die Narkose abgesetzt werden mußte. Auch ein Versuch, die Abwehrbewegungen der Tiere gegen die Rückenlage durch das Muskelrelaxans MY 301 (*Guajakolglycerinäther*, Firma Brunnengräber) zu unterbinden, scheiterte, da auch bei diesem Mittel noch erhebliche Abweichungen im Kurvenverlauf auftraten. Wir arbeiteten deshalb später nur noch mit nicht narkotisierten Tieren, die an die Rückenlage gewöhnt worden waren.

a) Der Einfluß der Veronalnatriumnarkose auf die Resorption. 12 Kaninchen erhielten 0,05 g/kg Körpergewicht Veronalnatrium intravenös injiziert. Zum Vergleich dienten neun nicht narkotisierte Tiere.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigen Abb. 13a und b. Es ergab sich, daß die Resorption der Testlösung aus dem Kniegelenk bei mit Veronalnatrium

narkotisierten Tieren gegenüber nicht narkotisierten Tieren verzögert war. Außerdem fiel die sehr große Streuung der Meßwerte (Abb. 13b) innerhalb der Narkosegruppe auf.

Ein Vergleich beider Gruppen ergibt, daß 20 min nach intraartikulärer Injektion der Testlösung die Aktivität über dem Gelenk bei den mit Veronalnatrium narkotisierten Tieren im Mittel auf $33,5 \pm 11,4\%$ gegenüber $20,5 \pm 3,2\%$ beim nicht narkotisierten Tier abgefallen ist. Die Resorption wird also durch die Narkose bei einem P von kleiner als 0,001 signifikant verzögert.

b) Der Einfluß der Evipannatriumnarkose auf die Resorption. Bei zehn Tieren wurde 0,05 g/kg Körpergewicht Evipannatrium in 10%iger Lösung langsam intravenös injiziert. Bei allen Tieren war im Gegensatz zu den Tieren der Veronalnatriumgruppe eine starke Exitation zu beobachten. Drei Tiere starben während der Injektion. Bei sieben Tieren wurde die Resorption unter Evipannarkose geprüft. Als Vergleichstiere dienten die der vorherigen Gruppe.

Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Sie besagt, daß bei Evipannatriumnarkose die Resorption der Testlösung aus dem Gelenk 20 min

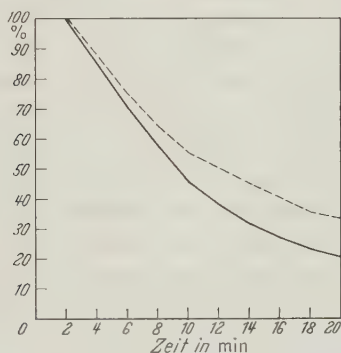


Abb. 14. Vergleich der Mittelwerte narkotisierter (Evipan) Tiere mit der Normalkurve. ---- Narkose

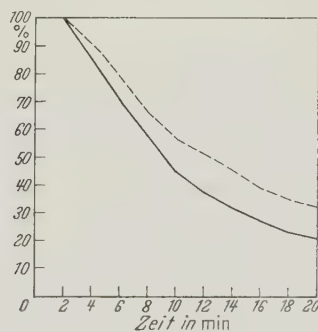


Abb. 15. Vergleich der Mittelwerte mit MY 301 behandelten Tiere mit der Normalkurve. ---- MY 301

nach der Injektion mit einem Wert von $34,2 \pm 10,9\%$ im Vergleich zu nicht narkotisierten Tieren mit einem 20 min-Wert von $20,5 \pm 3,2\%$ bei einem P von kleiner als 0,001 signifikant verzögert war. Die Resorptionsverzögerung durch Evipannatriumnarkose lag in der gleichen Höhe wie bei Veronalnatrium ($33,5 \pm 11,4\%$). Auch in dieser Gruppe fiel die sehr große Streuung der Meßwerte von Tier zu Tier auf, die, bezogen auf den 20 min-Wert, Werte von 23,7—50,4% ergaben.

c) Der Einfluß des Muskelrelaxans MY 301 (Guajakolglycerinäther) auf die Resorption. Bei sieben Kaninchen wurden zwischen 2 und 3 cm³ MY 301 intravenös injiziert. Unmittelbar nach der Injektion trat völlige Muskelentspannung ein, die 15—20 min anhielt. Die gleiche Menge des Mittels konnte nach Ablauf dieser Zeit noch einmal injiziert werden, ohne daß Zwischenfälle bezüglich Atmung oder Kreislauf beobachtet wurden. Die Resorption war nach intravenöser Gabe von MY 301 mit einem Mittel von $32,9 \pm 9,9\%$ gegenüber $20,5 \pm 3,2\%$ bei den nicht vorbehandelten Tieren bei einem P von kleiner als 0,001 signifikant verzögert. Auch bei diesen Tieren war wie bei denen der Gruppe 1 (Veronal) und 2 (Evipan) eine erhebliche Streuung der Meßwerte zu beobachten (Abb. 15).

d) **Ergebnisse.** Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß sowohl eine Barbituratnarkose als auch das Muskelrelaxans MY 301 (Guajakolglycerinäther) einen Einfluß auf die Resorption einer intraartikulär injizierten Lösung haben. Bei allen diesen Mitteln ist die Resorption gegenüber der Norm signifikant verzögert. Auffallend ist die sehr große Streubreite der gemessenen Resultate, die am größten bei Veronal, geringer bei Evipan und am kleinsten bei MY 301 war. Die Ergebnisse geben keinen Aufschluß über einen Angriffspunkt dieser Mittel. Die Untersuchungen von DUESBERG und SCHRÖDER (1944) zeigen, daß Barbitursäuren zu einer Verkleinerung des Minutenvolumens und einer Erhöhung des peripheren Widerstandes führen können. JUNGBLUT und KUSCHINSKY (1955) stellten fest, daß eine Narkose mit Nembutal (Pentobarbital) zu einer Blutdrucksenkung und zu einem stark erhöhten Gefäßtonus in der Nierenrinde bei weitgehender Blutleere der Glomerula führen kann. Wenn auch aus der Reaktionsweise des Nierengeäßsystems nicht ohne weiteres auf die der Gefäße des Stratum synoviale geschlossen werden kann, so dürfte doch aus den geschilderten Versuchsergebnissen in Verbindung mit den Befunden der erwähnten Autoren die Schlußfolgerung zulässig sein, daß die während einer Barbituratnarkose beobachtete Resorptionsverzögerung aus dem Kniegelenk des Kaninchens auf einer veränderten Durchblutung des Stratum synoviale während der Narkose beruht. Über die Wirkung des MY 301 auf den Kreislauf bzw. die peripheren Gefäße ist nach Angaben der Herstellerfirma wenig bekannt. Die von SIXT an Hunden beobachtete arterielle Druckschwankung nach MY 301 kann nicht berücksichtigt werden, da die Ergebnisse an unter Morphin-Pernoctonnarkose stehenden Tieren erzielt wurden, in der die allgemeine Gefäßtonuslage wahrscheinlich schon verändert war. Eine Kontraktion der peripheren Gefäße bei Ratten und eine gewisse gefäßabdichtende und entzündungshemmende Wirkung des MY 301 wurde von CHEMNITIUS, BOLZE und HOFMANN beschrieben.

Auf Grund der eigenen Versuchsergebnisse dürfte MY 301 eine Resorptionsverzögerung aus dem Kniegelenk des Kaninchens über das Gefäßsystem bewirken. Die Versuche mit Barbituratnarkose und dem Muskelrelaxans MY 301 zeigen, wie wichtig es bei Resorptionsversuchen ist, die Eigenwirkung des verwandten Narkosemittels auf die Resorption zu prüfen.

6. *Der Einfluß des Cortison auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale*

Spreadingsexperimente (ASHBOE-HANSEN 1954, OPSAHL 1949, SEIFTER 1949) ergaben, daß während einer Cortisonbehandlung eine Hemmung der Hyaluronidasewirkung auftritt. Gelegentlich wurde deshalb Cortison als Antagonist der Hyaluronidasewirkung angesehen (SEIFTER). OPSAHL fand nach Adrenalectomie eine merkliche Steigerung der Hyaluronidasewirkung gemessen an der Ausbreitung intradermal injizierter Farbstoffe. Da dieser Effekt jedoch nur am lebenden Tier zu beobachten war, kam die Autorin zu dem Schluß, daß eine Antihyaluronidasewirkung durch Cortison nur bei intaktem Kreislauf zu erzielen sei. Im Gegensatz zu OPSAHL und SEIFTER fand HECHTER (1947), daß die Aktivität der Hyaluronidase der Kaninchenhaut weder in vitro noch in vivo durch Cortison gehemmt werde und bezweifelt daß Cortison direkt in den Hyaluronidasemechanismus eingreift. ASHBOE-HANSEN fand eine verminderte Hyaluronidaseaktivität an der Kaninchenhaut unter Cortisonbehandlung. Er deutet seine Befunde dahingehend, daß während einer Cortisonbehandlung injizierte Hyaluronidase auf weniger und verändertes Substrat (Grundsubstanz) trifft. Nach seinen Untersuchungen soll unter Cortisoneinwirkung die metachromatische und zwar nur die hyaluronidaseempfindliche Grundsubstanz abnehmen. Diese Abnahme der Grundsubstanz soll auf einer primären Einwirkung des Cortisons auf die Mastzellen als Bildungs-

stätte der Mucopolysaccharide der Grundsubstanz, möglicherweise über die Vorstufe Heparin [(HOLMGREEN und WILANDER (1937))] beruhen. Die Zahl der als Mastzellen angesprochenen Elemente nehme ab. Die in den Zellen vorhandenen Granula, als wahrscheinliche Vorstufe der Grundsubstanz (STAEMLER 1921), schwänden, es sollen ferner Zellvakuolen auftreten. Gerade im Stratum synoviale finden sich nach ASHBOE-HANSEN reichlich Mastzellen in örtlich verschieden starker Anhäufung entlang der Grenzlinie der inneren Synovialzellschicht. Während die von dem Autor als Mastzellen angesprochenen Elemente in den tiefen Lagen des Stratum synoviale stark granuliert sein sollen, färben sie sich in den oberen, der Gelenkhöhle zugewandten Schichten, nur schwach an. Die Grundsubstanz zeige ein reziprokes Verhalten. Die oberflächlichen Schichten des Stratum synoviale sollen eine starke Metachromasie zeigen, die sich nach der Tiefe zu verliere. Weder Kapillaren noch Lymphgefäße haben an irgendeiner Stelle freien Zutritt zum Gelenkkavum. Sie sind von einer oder mehreren Schichten Synovialiszellen bedeckt. Auch an den Stellen, an denen eine solche Schicht fehlt, z. B. in den Buchten zwischen zwei Zotten (WATZKA 1958), sind sie immer mit einer wechselnd starken Schicht Grundsubstanz bedeckt. Wenn nun infolge einer hypothetischen Beeinflussung durch Cortison die Grundsubstanz verändert wird — gleichgültig, ob durch eine direkte Einwirkung oder auf dem Wege über die Mastzellen — dann müßte nach Cortisonanwendung durch die sich zwangsläufig ergebende Änderung der Diffusionsverhältnisse für Lösungen durch das Stratum synoviale auch die Resorption aus einem Gelenk beeinflußt werden.

Es wurden deshalb folgende Versuche durchgeführt:

Bei vier Kaninchen injizierten wir 1 Std vor Versuchsbeginn 5 mg Cortison intramuskulär. Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von 0,05 g/kg Evipannatrium gelöst in 2,5 cm³ Kochsalzlösung (0,85%) narkotisiert. Als Vergleich dienten neun Tiere mit Evipannarkose ohne Vorbehandlung. (Die Wirkung der Narkose auf die Resorption war uns bei diesen zu Beginn der Versuchsreihe durchgeführten Untersuchungen noch unbekannt.)

Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt Abb. 16. Bei mit Cortison vorbehandelten Kaninchen war 20 min nach Injektion der Testlösung in die Gelenke die Aktivität über dem Gelenk im Mittel auf $36,5 \pm 4,7$ abgefallen. Bei den nicht vorbehandelten und mit Evipannatrium in gleicher Dosierung narkotisierten Kontrolltieren betrug die Aktivität über dem Gelenk nach 20 min $34,2 \pm 10,9\%$.

Die Ergebnisse unterscheiden sich bei einem *P* von 0,4 nicht signifikant voneinander. Wie aus Abb. 16 ersichtlich, verlaufen beide Kurven in mäßigem Abstand parallel zueinander. Cortison übt also in der angegebenen Dosierung keinen Einfluß auf die Resorptionsfähigkeit des normalen Stratum synoviale aus.

Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von SEIFTER u. Mitarb. (1954), die beim normalen Kaninchen nach Vorbehandlung mit Cortison eine Hemmung der Resorption intraartikulär injizierten Phenolsulfonphthaleins

(gemessen an dessen renaler Ausscheidung) fanden. Nach SEIFTER soll durch Cortison die Zusammensetzung der Grundsubstanz direkt in Richtung einer Permeabilitätsverminderung geändert werden. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß SEIFTERS Ergebnisse an Tieren erzielt wurden, bei denen das Stratum synoviale bereits geschädigt gewesen sein muß. Somit ist ein Vergleich dieser mit unseren eigenen Ergebnissen auch in beschränktem Umfang nicht

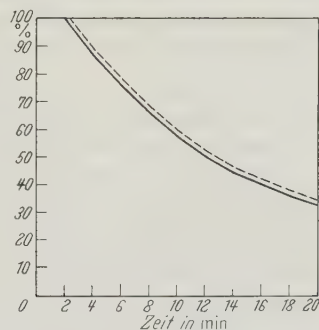


Abb. 16. Vergleich der Mittelwerte der mit Cortison vorbehandelten Tiere mit der Kontrollgruppe. — Kontrolle, --- Cortison. Beide Versuchsgruppen waren mit Evipannatrium narkotisiert

möglich. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, daß eine Änderung in der Zusammensetzung des Bluteiweißes der Versuchstiere durch die Cortisonbehandlung und damit auch eine Änderung des Kopplungsvermögens des benutzten Indikatorfarbstoffes mit den Eiweißkörpern bei diesen Versuchen nicht berücksichtigt wurde. Die Ergebnisse SEIFTERS konnten auch von PAUL u. Mitarb. (1952) nicht bestätigt werden. Sie fanden zwar eine merkliche klinische Besserung des Krankheitsbildes durch Cortisonbehandlung bei rheumatischen Arthritiden, jedoch keine Beeinflussung der Resorptionsfähigkeit der Gelenke für Phenolsulfonphthalein. Auch bei Kaninchen konnte keine Wirkung des Cortisons auf die Resorption aus den Kniegelenken gefunden werden. Zu den gleichen Resultaten kamen EDLUND (1949), MOFFET (1954) und HIDALGO (1952). Zusammenfassend kann man feststellen, daß Cortison die Resorptionsfähigkeit des intakten Stratum synoviale nicht beeinflusst.

7. Die Wirkung intraartikulär injizierter Hyaluronidase auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale

Die Hyaluronidasen stellen einen Fermentkomplex dar, dessen spezifische Eigenschaften darin bestehen, Mucopolysaccharide mesenchymaler Herkunft, aufzuspalten.

Die je nach Art des Gelenkes verschiedene Viskosität der Synovia ist durch deren Gehalt an Hyaluronsäure bedingt (MEYER, SMITH und DAWSON 1939, ROPES und BAUER 1953, GOGGESHALL, WARREN und BAUER 1940, RAGAN und MEYER 1950). Der Gehalt der Synovia an Mucin von 0,3—0,8% bedingt einen osmotischen Sog von 250 mm H₂O gegenüber dem Blute. Während man früher annahm, daß die Synovia ein Abnützungsprodukt der Synovialzellen darstellte (MARQORDT 1931), dürfte nach den neueren Arbeiten von VAUBEL (1933) BAUER, ROPES und WAINE (1940), LANG (1957), MAIBACH (1953) u. a. feststehen, daß die Synovia ein Ultrafiltrat des Blutes darstellt, dem durch aktive Leistung der Synovialzellen Mucine (Hyaluronsäure) beigemischt werden. Die Herkunft eines Teiles der Mucine aus dem Knorpel ist nach den Untersuchungen MAIBACHS zwar nicht völlig auszuschließen, jedoch sehr unwahrscheinlich. Im Gelenk liegt (nach MAIBACH bereits in der Synovialzelle) die Hyaluronsäure als freie Säure oder vorwiegend als Kaliumsalz vor. Die Molekülgröße unterliegt starken Schwankungen. Der Polymerisationsgrad ist abhängig von pH und vom Ionenmilieu (MADINAVETIA und QUIBBEL 1941).

Während die Wirkung der Hyaluronidase auf das Unterhautbindegewebe als Folge einer Depolymerisierung der Kittsubstanz, Auflockerung des Gewebes, schnellere Ausbreitung von eingebrachten Farbstoffen und wäßrigen Lösungen angegeben wird, wissen wir über ihre Wirkung am Stratum synoviale und ihren Einfluß auf die Resorptionsfähigkeit dieses Gewebes sehr wenig. In Analogie zum Unterhautbindegewebe war zu erwarten, daß es nach intraartikulärer Injektion von Hyaluronidase zu einer Auflockerung der interzellulären Kittsubstanz zwischen den Synovialzellen, einem schnelleren Flüssigkeitsdurchtritt durch die Synovialzellschicht und dementsprechend zu einem schnelleren Abtransport der injizierten Testlösung durch bessere Kontaktmöglichkeit mit Blut oder Lymphsystem kommen würde.

Zur Prüfung der Frage nach der Wirkung intraartikulär injizierten Hyaluronidase auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale wurden unter den angegebenen Versuchsbedingungen verschiedene Experimente durchgeführt.

Bei vier Kaninchen wurden 50 E einer Hodenhyaluronidase gelöst in 0,2 cm³ physiologischer Kochsalzlösung mit einem pH von 4,6 in ein Kniegelenk injiziert. Nach 45 min wurde 0,11 cm³ der radioaktiven Testlösung injiziert und der Abfall der Aktivität über dem behandelten Gelenk gemessen.

20 min nach der Injektion der Testsubstanz war die Aktivität der injizierten Lösung bei den mit Hyaluronidase vorbehandelten Tieren auf $34,7 \pm 1,3\%$ abgefallen. Das bedeutete im Vergleich zum nicht vorbehandelten Tier mit einem

Wert von $20,5 \pm 3,2\%$ eine signifikante Verzögerung, bei einem P von kleiner als 0,001 (s. Abb. 17).

In einem weiteren Versuch erprobten wir die Wirkung einer einmaligen Injektion von 50 E Hyaluronidase in die Gelenkhöhle über einen mehrtägigen Zeitraum; alle Messungen wurden am gleichen Tier durchgeführt. Beim unvorbehandelten Tier fand sich 20 min nach der Injektion der Testlösung ein Abfall der Aktivität über dem Gelenk auf 22,5%. Ein 2 Tage später 45 min nach intraartikulärer Injektion von Hyaluronidase durchgeführter Versuch ergab einen Abfall der Aktivität im gleichen Zeitraum auf 33,2%, also eine Verzögerung der Resorption wie bei den Tieren der vorherigen Gruppe. Vier Tage nach der

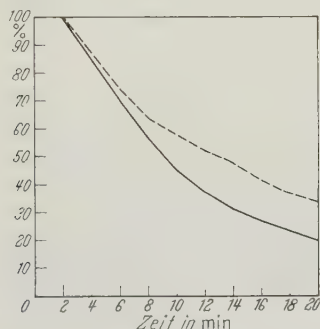


Abb. 17. Vergleich der Mittelwerte der mit Hyaluronidase vorbehandelten Tiere und der Normalkurve. ---- Hyaluronidase, — Normalkurve

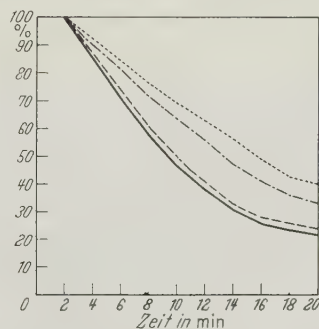


Abb. 18. Vergleich der nach einmaliger Hyaluronidaseinjektion gewonnenen Resorptionskurven bei einem Tier. — Unvorbehandelt, ---- 45 min nach Hyaluronidase, 4 Tage, -.-.- 14 Tage

einmaligen Hyaluronidaseinjektion lag der Meßwert bei 40,5%, um sich 14 Tage nach der Hyaluronidasebehandlung mit einem Wert von 25,2% wieder der Norm zu nähern (s. Abb. 18).

Ein weiterer Versuch sollte die Wirkung einer mehrmaligen Hyaluronidaseinjektion am gleichen Kniegelenk erproben. Es wurden insgesamt 125 E Hyaluronidase über einen Zeitraum von 2 Tagen bei einem Tier intraartikulär injiziert. Schon am ersten Tag nach der Injektion war das Gelenk geschwollen und gerötet. Am dritten Tage nach der ersten Injektion wurde das Tier dem Versuch unterworfen. Es zeigte sich, daß die Resorption gemessen am Aktivitätsabfall wie bei den anderen bisher untersuchten Tieren verzögert war. Es ergab sich ein 20 min-Wert von 34% gegenüber 20,5% beim nicht vorbehandelten Tier.

Aus den bisherigen Ergebnissen ist eindeutig zu ersehen, daß Testeshyaluronidase (Kinetin Schering) in der von uns angewandten Form bei einem nach GIBIAN optimalen pH von 4,6 die Resorption einer intraartikulär injizierten wäßrigen Lösung nicht beschleunigt, sondern signifikant verzögert.

Weitere Versuche sollten die Wirkung der Hyaluronidase auf die Resorption hochmolekularer Stoffe aus dem Gelenk prüfen. Als Testsubstanz diente ein radioaktives Polyphosphat mit einer Molekülgröße von 100 000 Å. Die Testlösung enthielt 0,3 mg Substanz pro Kubikzentimeter. Der Versuch wurde mit zwei Tieren durchgeführt. Injiziert wurden pro Tier 0,30 cm³ entsprechend 0,09 mg Substanz. Ein Vergleich der Resorptionsverhältnisse bezüglich großmolekularer Lösung zu derjenigen der wäßrigen Normallösung zeigt, daß die Resorption der großmolekularen Lösung mit einem 20 min-Wert von 89,0% und 84,5% gegenüber 20,5% bei der Normallösung stark verzögert ist (Abb. 19).

Bei einem Tier wurde 35 min nach der intraartikulären Injektion der hochmolekularen Lösung (also zu einem Zeitpunkt, an welchem noch 72% der injizierten Menge im Gelenk war), 50 E Hyaluronidase injiziert. Die Hyaluronidase beschleunigt nicht etwa den Abtransport (Abb. 20), sondern verzögert ihn anscheinend. Der gleiche Effekt war bei einem anderen Tier zu beobachten, bei

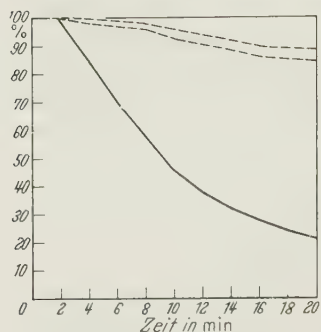


Abb. 19. Vergleich der Resorption großmolekularer Lösung mit der Normallösung. — Normallösung, ---- großmolekulare Lösung

dem 170 min nach Injektion der Testlösung noch 38% des injizierten Materials im Gelenk vorhanden war. Auch hier trat nach Injektion der Hyaluronidase eher eine Verzögerung des Abtransportes auf.

Es ist klar, daß aus den mit hochmolekularer Lösung durchgeführten Versuchen — zumal sie nur an zwei Tieren durchgeführt wurden — keine bindenden Schlüsse hinsichtlich der Wirkung der Hyaluronidase auf die Resorption großer Moleküle aus der Gelenkhöhle gezogen werden können. Die Tatsache jedoch, daß bei beiden Tieren nach Injektion der Hyaluronidase eine Veränderung der Kurve im Sinne einer Resorptionsverzögerung auftrat, läßt in Verbindung mit den vorherdurchgeführten Untersuchungen den Schluß zu, daß es sich hier wie dort um einen der Hyaluronidase eigenen Effekt gehandelt hat. Der in Abb. 20 bei beiden Tieren nach Hyaluronidaseinjektion sichtbare Anstieg der Kurve dürfte darauf zurückzuführen sein, daß durch Auflockerung des Stratum synoviale eine

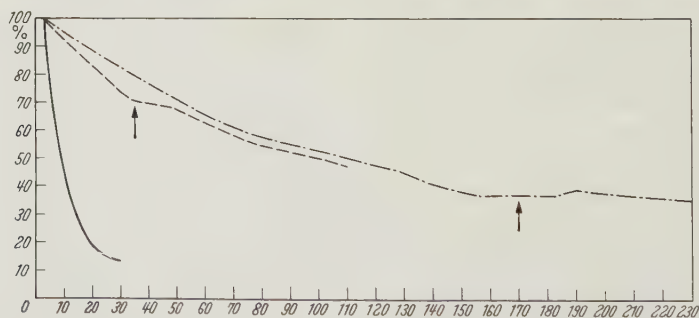


Abb. 20. Die Wirkung der Hyaluronidase auf die Resorption hochmolekularer Lösungen aus dem Kniegelenk im Vergleich zur Normalkurve. — Normalkurve, ---- Polyphosphat: Tier IX, - · - · - Tier X (Pfeil = Hyaluronidaseinjektion)

vermehrte Diffusion der hochmolekularen Lösung in das Synovialgewebe erfolgt, und daß dementsprechend die Kurve im Sinne einer Resorptionsverzögerung ansteigt. Ein beschleunigter Abtransport der Lösung, der auf Grund der Molekülgröße nach GARDNER lymphogen erfolgen sollte, war nicht zu beobachten.

Die am Kniegelenk des Kaninchens 45 min nach Injektion von 50 E Hyaluronidase durchgeführten Versuche zeigen eindeutig, daß die Resorption der injizierten niedermolekularen radioaktiven Testlösung gegenüber den nicht vorbehandelten Tieren signifikant verzögert ist. Das widersprach der Erwartung, daß durch Depolymerisierung der Synovialgrundsubstanz und Auflockerung des

Synovialgewebes durch die Hyaluronidase der Widerstand des Gewebes gegen das Eindringen der später injizierten Testlösung herabgesetzt würde. Verminderung des Gewebswiderstandes gegen das Eindringen einer Lösung bedeutete schnellere Ausbreitung der eingebrachten Lösung, dementsprechend bessere Kontaktmöglichkeit mit resorbierenden Kapillaren und schnellerer Abtransport. Die Befunde von SEIFTER u. Mitarb., die eine schnellere Resorption von Phenolsulfonphthalein aus Kaninchengelenken nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase sahen, schienen diese Ansicht zu bestätigen. Es konnte jedoch im Gegensatz zu den Befunden SEIFTERS in unseren Untersuchungen niemals eine Beschleunigung

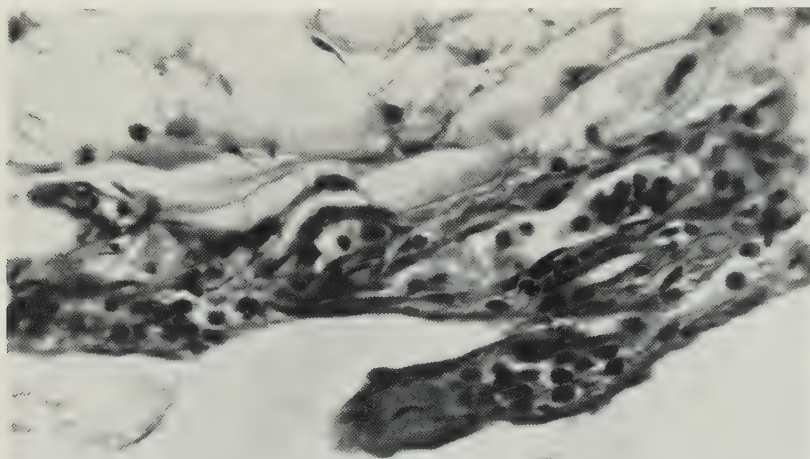


Abb. 21. Das Stratum synoviale 45 min nach Injektion von 50 E Hyaluronidase in die Gelenkhöhle. Beschreibung s. Text

der Resorption nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase beobachtet werden. Wie ist der Widerspruch zwischen den theoretisch zu erwartenden und den gewonnenen Ergebnissen zu erklären? Zur Klärung dieser Frage zogen wir die histologische Untersuchung heran.

Bei insgesamt acht Tieren wurden je 50 E Hyaluronidase (pH 4,6) in ein Kniegelenk injiziert. Während vier Tiere nach 45 min getötet wurden, töteten wir die restlichen vier Tiere nach 24 Std. Die behandelten Kniegelenke wurden in 10%igem Formalin fixiert. Nach der Fixation wurde die Gelenkkapsel mit dem Stratum synoviale abpräpariert, in Paraffin eingebettet und in Stufenschnitten aufgearbeitet. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Die histologische Untersuchung ergab:

45 min nach Injektion der Hyaluronidase sind Zotten und subsynoviales Gewebe aufgelockert. Die Kapillaren der Synovialzellschicht, aber auch die Gefäße der subsynovialen Gebiete sind erweitert und prall mit Blut gefüllt. Es finden sich vereinzelt kleine Petechien. Die Zellen der Synovialzellschicht („Intima“) liegen zwar noch im Verband, doch beginnen sich einzelne Zellen aus ihm zu lösen. Im subsynovialen Gewebe, aber auch in der Synovialzellschicht findet man um einzelne Kapillaren und Gefäße wenige Granulozyten (s. Abb. 21). Nach 24 Std sind alle diese Veränderungen erheblich verstärkt. Die Synovialzellen sind stellenweise völlig abgeschilfert. Die kapilläre Hyperämie hat zugenommen. Es werden reichlich flächenhafte Blutungen bei starker Auflockerung der subsynovialen Gewebsschicht angetroffen; letztere ist von reichlich Granulozyten durchsetzt.

An einzelnen Stellen, besonders zwischen den Buchten der Zotten, findet man einen Belag aus Fibrin mit Granulozyten. Es findet sich also schon nach 45 min das Bild einer

Entzündung. Nach 24 Std hat diese sich zur voll ausgeprägten flächenhaften Synovitis verstärkt (Abb. 22).

Die histologischen Befunde nach intraartikulärer Injektion von Hyaluronidase werden durch die Arbeiten von SEIFTER (1949, 1954), HEINLEIN (1949) und BENSLEY (1950) bestätigt und sind nach HECHTER (1947) wahrscheinlich durch Begleitsubstanzen bzw. durch Freisetzen von Histamin durch die Hyaluronidase bedingt. CHAMBERS und ZWEIFACH (1947) konnten bei direkter Einwirkung der Hyaluronidase auf das Mesenterium von Ratte und Katze beobachten, daß Kapillarwandrupturen auftraten. Diese Rupturen führen CHAMBERS und ZWEIFACH nicht auf eine direkte Schädigung der Endothelien bzw. ihrer Kittsubstanz

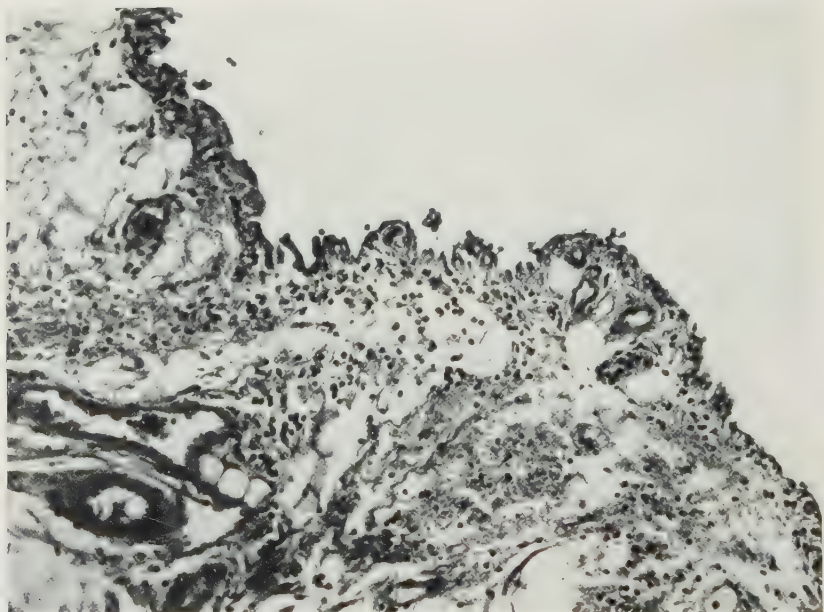


Abb. 22. Das Stratum synoviale 24 Std nach Injektion von 50 E Hyaluronidase in die Gelenkhöhle. Beschreibung s. Text

zurück, sondern auf eine Verflüssigung der Gelmatrix also des Stützgerüsts der Kapillaren. Aus der Störung dieser Komponente des Kapillarsystems resultiert zwangsläufig eine Änderung der Permeabilität des Systems Interstitium-Kapillare, die auch bei nicht direkt alterierter Kapillarwand zu einem Anstieg der Auswärtsfiltration führen muß; ihr Endresultat ist das nach Hyaluronidaseinjektion zu beobachtende interstitielle Ödem. Diese Zunahme der Auswärtsfiltration in das Gewebe wurde von DURAN-REYNALS (1942), ELSTER u. Mitarb. (1949), AYLWARD (1937), MEYER (1947), MOFFET (1954) nachgewiesen, die nach intravenöser Applikation von Evans Blue (T 1824) einen vermehrten Austritt von Farbstoff nach Hyaluronidaseanwendung und eine Abnahme des Blutvolumens feststellten. In diesem Sinne sprechen auch die Beobachtungen von HIDVEGI (1954), der unter Hyaluronidaseeinwirkung einen vermehrten Durchtritt von Penicillin in die Gelenkhöhle fand. Wenn wir hinsichtlich unsere Versuchsergebnisse von der Veränderung des kolloidosmotischen Gefüges und der

daraus resultierenden Änderung der Permeabilität des Gewebes durch die Hyaluronidaseeinwirkung absehen, dann ist die durch die Hyaluronidase induzierte Entzündung für die Resorptionsverzögerung verantwortlich zu machen. Jede Entzündung führt zu einer Umstellung des örtlich betroffenen Kreislaufes in Richtung Prästase-Stase mit Hyperämie und Kapillarerweiterung, wie sie histologisch schon 45 min nach Hyaluronidaseinjektion festzustellen ist. Mit der Erweiterung des Kapillarsystems ist eine Herabsetzung der Durchblutungsgeschwindigkeit und ein Austritt flüssiger Blutbestandteile verbunden. Ein vermehrter Flüssigkeitsaustritt aus dem Gefäßsystem bedeutet jedoch eine Verdünnung der injizierten Testsubstanz bzw. Lösung. Es ist anzunehmen, daß von einer resorbierenden Oberfläche in der Zeiteinheit die gleiche Flüssigkeitsmenge aufgenommen wird. Wird jedoch, wie im vorliegenden Falle, die Testlösung durch das entzündliche Exudat verdünnt, dann wird bei normaler Durchblutung und Resorption zwar die gleiche Flüssigkeitsmenge, jedoch je nach Verdünnung der in der Flüssigkeit enthaltenen Indikatorsubstanz weniger Substanz resorbiert. Zu dieser aus der Verdünnung der Testlösung durch das entzündliche Exudat resultierenden Verzögerung kommt nun noch eine Störung des gesamten hydrostatisch-onkotischen Gefüges des von der Entzündung betroffenen Gewebes durch den Austritt eiweißreicher Flüssigkeit aus dem Kapillarsystem. Ein Austreten von Eiweiß aus dem Gefäßsystem muß zu einem Abfall des onkotischen Druckes im venösen Kapillarschenkel und dementsprechend zu einer Verminderung des Einstromes von Flüssigkeit aus dem Interstitium in die Kapillare führen. Verminderter Einstrom von Flüssigkeit aus dem Interstitium in das Kapillarsystem bedeutet aber eine Verzögerung der Resorption. Darüber hinaus ist noch die aus der Kapillarerweiterung sich ergebende verminderte Durchströmungsgeschwindigkeit zu erwähnen, die ebenfalls zu einer Änderung des Flüssigkeitsaustausches zwischen Interstitium und Blut führen muß. Aus dem Zusammenwirken dieser Faktoren kann die von uns beobachtete Resorptionsverzögerung nach intraartikulärer Injektion von Hyaluronidase erklärt werden. Die in verschiedenen Zeitabständen nach Hyaluronidaseinjektion am gleichen Tier durchgeführten Versuche zeigen, daß die Resorption aus der Gelenkhöhle mit Zunahme der Entzündung verzögert wird, um nach deren Abklingen wieder annähernd normale Werte zu erreichen.

Die beobachteten Ergebnisse finden eine Teilbestätigung durch Befunde MOFFETS (1954) am Kniegelenk der Ratte. Der Autor injizierte Diodrastlösung in die Kniegelenke narkotisierter Ratten und fand eine Resorptionszeit von 30 min. Dieser Wert entspricht unter Berücksichtigung des von MOFFET angewandten hohen Injektionsdruckes annähernd unseren Meßwerten beim Normaltier. Bei Zugabe von Hyaluronidase fand MOFFET zwar einen vermehrten Einstrom des Injektionsmittels in das Gelenk, der Abtransport änderte sich jedoch zeitlich nicht. Im Gegensatz zu unseren und MOFFETS Ergebnissen stehen die Befunde von SEIFTER (1949), der eine Steigerung der Resorption aus dem Gelenk des Kaninchens durch Hyaluronidase angibt. SEIFTERS Befunde konnten von PAUL u. Mitarb. (1952) und HIDALGO u. Mitarb. (1952) unter Anwendung der von SEIFTER angegebenen Methodik der intraartikulären Injektion von Phenolsulfonphthalein am Kniegelenk von Mensch und Tier nicht bestätigt werden. SEIFTER führt die abweichenden Ergebnisse der erwähnten Autoren darauf

zurück, daß von diesen eine falsche Injektionstechnik angewandt und die Versuche nicht am Talocruralgelenk des Kaninchens, sondern am Kniegelenk durchgeführt worden seien. Das Kniegelenk des Kaninchens sei für diesen Test nicht verwendbar, da die Meßwerte stark variieren würden. Unseres Erachtens besteht jedoch kein Grund für die Annahme, daß die Resorptionsfähigkeit des Kniegelenkes bei gleichem Aufbau des Stratum synoviale eine andere sein sollte als die des Talocruralgelenkes. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, daß die von SEIFTER injizierte Menge von $0,25 \text{ cm}^3$ Phenolsulfonphthalein auf die Größe des Talocruralgelenkes eines Kaninchens bezogen beträchtlich ist und zu einer intraartikulären Druckerhöhung führen muß. An Hand mit der Methode SEIFTER

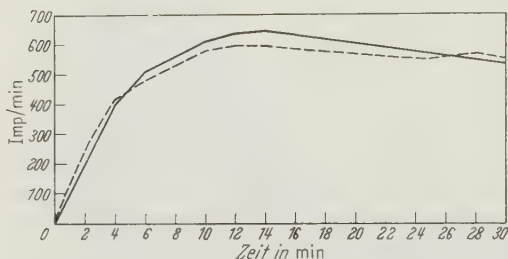


Abb. 23a. Vergleich der Aufnahme intraartikulär injizierter Testlösung in das Blut ohne (—) und mit Hyaluronidase (----)

durchgeführter Versuche konnte ich feststellen, daß intraartikuläre Injektion dieser Flüssigkeitsmenge immer zu einer Auftreibung des Talocruralgelenkes führt. Es ist anzunehmen, daß der so erzeugte intraartikuläre Druck weit oberhalb des für das Stratum synoviale typischen Brechpunktes liegt. Es wurde also von vorneherein unter artefiziell pathologischen Bedingungen gearbeitet, so daß ein Vergleich der mit dieser Methode gewonnenen und den von uns unter weitgehend physiologischen Bedingungen erzielten Ergebnisse nur bedingt möglich ist.

Es könnte nunmehr bezüglich der Versuchsergebnisse eingewandt werden, daß die Versuche zur Prüfung der Hyaluronidasewirkung auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale erst zu einem Zeitpunkt durchgeführt worden seien, an dem das Stratum synoviale durch die Hyaluronidase oder ihre Begleitsubstanzen entzündlich verändert war. Damit wäre also nicht die eigentliche Wirkung der Hyaluronidase, sondern die der Entzündung geprüft worden.

Es mußte deshalb die direkte Wirkung der Hyaluronidase zum Zeitpunkt der Injektion der Testlösung nachgeprüft werden.

Wir injizierten deshalb bei vier Kaninchen Hyaluronidase zusammen mit der Testlösung in die Kniegelenke und prüften die Zunahme der Aktivität des Blutes. Als Vergleichsgruppe dienten die Tiere, bei denen die Aufnahme intraartikulär injizierter radioaktiver Testlösung in das Blut geprüft worden war. Diese Versuchstechnik wurde deshalb angewandt, damit nicht durch eine eventuelle vermehrte Diffusion der Testlösung in das Stratum synoviale und Fortfall filternder Schichten bei einer Messung des Aktivitätsabfalles über dem Gelenk falsche Meßwerte erzielt wurden. Es wurden bei jedem Tier 50 E Hyaluronidase gelöst in $0,2 \text{ cm}^3$ Kochsalzlösung (pH 4,6) zusammen mit $0,3 \text{ cm}^3$ der Testlösung injiziert. Die durch Erhöhung der Injektionsmenge größere bedingte intraartikuläre Druckerhöhung gegenüber den Kontrolltieren mußte vorerst unberücksichtigt bleiben. Das Resultat dieser Versuche gibt Abb. 23a wieder.

Es zeigte sich, in Bestätigung der Befunde MOFFETTS am Kniegelenk der Ratte, daß Hyaluronidase zusammen mit der Testlösung injiziert, die Resorption nicht beschleunigt. In diesem Zusammenhang seien die Befunde von BRAUN-FALCO und WEBER (1952, 1953) erwähnt, die keine Beschleunigung der Resorption intra-muskulär injizierten Penicillins durch Hyaluronidasezusatz nachweisen konnten.

Die Autoren konnten jedoch in Bestätigung der Befunde HEINLEINs (1949) am Orte der Applikation eine Entzündung feststellen und beobachten, daß eine Crotonöldermitis durch Hyaluronidaseapplikation wesentlich verstärkt wurde.

In weiteren Versuchen gingen wir der Frage nach, ob die Wirkung der Hyaluronidase von der Stellung des Gelenkes und damit vom intraartikulären Druck abhängen könnte. Während die bisherigen Versuche in Rückenlage der Tiere bei weitgehend entspannter Gelenkkapsel durchgeführt worden waren, wurden die folgenden Versuche in normaler Hockstellung vorgenommen. Dabei wurde die Aufnahme der Testlösung in das Blut gemessen, da eine Messung über dem Gelenk in dieser Stellung sehr schwierig ist. Die Versuche wurden an drei Gruppen zu je vier Tieren durchgeführt (Injektionsmenge jeweils 0,2 cm³).

Gruppe 1: Rückenlage der Tiere. Weitgehende Entspannung der Gelenkkapsel bei einer Beugung von etwa 45°.

Gruppe 2: Wie Gruppe 1. Injektion von 0,1 cm³ = 25 E Hyaluronidase und 0,1 = 20 µC KH³²P³²O₄.

Gruppe 3: Hockstellung der Tiere. Injektion wie Gruppe 2. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigt Abb. 23 b.

Bei den Tieren in Rückenlage mit entspannter Gelenkkapsel ist keine Wirkung der Hyaluronidase zu beobachten, während die Resorption bei Hockstellung und gespannter Gelenkkapsel durch Hyaluronidase beschleunigt wird. Dies dürfte darauf beruhen, daß bei in Rückenlage der Tiere entspannter Gelenkkapsel und der geringen Injektionsmenge von 0,2 cm³ der für die Spreadingwirkung nötige Druck (HECHTER 1947) nicht erreicht wurde, während bei der Hockstellung und Spannung der Gelenkkapsel dieser Druck vorhanden war, so daß die Hyaluronidasewirkung zur Geltung kam. Damit waren ähnliche Verhältnisse gegeben, wie sie SEIFTER u. Mitarb. (1949, 1954) durch größere Injektionsmengen (bezogen auf die Gelenkgröße) experimentell erzeugt hatten. Insofern sind die Ergebnisse SEIFTERS bestätigt. Hyaluronidase kann also nur dann die Resorption beschleunigen, wenn sie zusammen mit der Testlösung unter einem bestimmten Druck injiziert wird. Ist jedoch durch die Hyaluronidase eine Entzündung induziert, dann wird die Resorption verzögert.

Die Versuche ergeben mithin:

1. Intraartikulär injizierte Hyaluronidase ist bei Entspannung der Gelenkkapsel nicht in der Lage, die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale zu steigern.

2. Intraartikulär injizierte Hyaluronidase bewirkt eine Entzündung des Stratum synoviale.

3. Im Stadium der Entzündung ist die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale vermindert.

4. Die Diffusion hochmolekularer Substanzen in das Synovialgewebe wird durch Hyaluronidase erleichtert, doch wird die Resorption dieser Stoffe nicht beschleunigt.

8. Der Einfluß der unspezifischen Fernentzündung auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale

Die meines Wissens einzigen Untersuchungen, die sich mit der Auswirkung einer gelenkfernen Entzündung auf die Resorption von Lösungen aus der Gelenkhöhle befassen, stammen von EDLUND (1949). Bei Kaninchen, bei denen durch

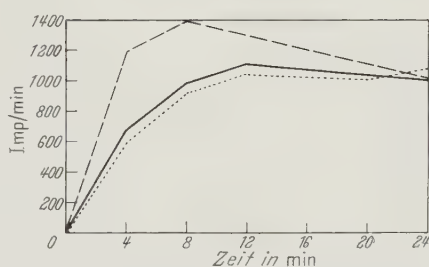


Abb. 23 b. Vergleich der Mittelwerte der Aktivitätszunahme im Blut bei entspannter Gelenkkapsel ohne Hyaluronidase (----), mit Hyaluronidase (—) und bei gespannter Gelenkkapsel mit Hyaluronidase (····)

Injektion einer Staphylokokkenkultur unter die Nackenhaut eine Entzündung gesetzt worden war, fand er 3 Std nach der Infektion, daß die Resorption von Hämoglobin und Ringerlösung aus dem Kniegelenk verzögert war. Zur Prüfung dieser Ergebnisse und zur weiteren Klärung der Reaktionsweise des Stratum synoviale führten wir folgende Versuche durch:

Bei vier Kaninchen wurde durch Injektion von $0,5 \text{ cm}^3$ 1%igen Crotonöls in die rechte Pleurahöhle eine Pleuritis erzeugt. Resorptionsversuche wurden am ersten und zweiten Tag nach der Ölinjektion durchgeführt. Am dritten Tage nach Injektion des Crotonöls starben zwei Tiere, so daß am vierten und sechsten Tag nur noch mit zwei bzw. einem Tier Versuche durchgeführt werden konnten. Wirkt sich eine Fernentzündung am Gelenk aus, dann müssen sowohl das rechte wie das linke Gelenk gleich beeinflußt werden. Daher wurden die Resorptionsversuche alternierend am rechten und linken Kniegelenk der Tiere durchgeführt.

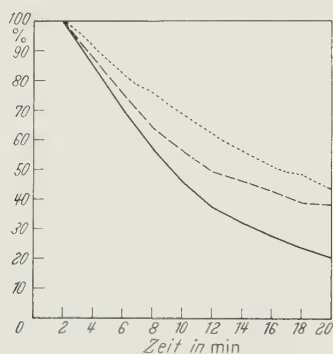


Abb. 24. Vergleich der Mittelwerte der bei Crotonölpleuritis gewonnenen Resorptionskurve mit der Normalkurve. — Normalkurve, --- erster Tag nach Crotonölinjektion, zweiter Tag

Einen Tag nach der intrapleurale Ölinjektion zeigten die Tiere in ihrem äußeren Aspekt keine Veränderungen. Es bestand keine Einschränkung der Atmung weder bezüglich der Atmungstiefe noch der Frequenz. Freßlust und Bewegungen unterschieden sich nicht von der eines Normaltieres.

Die Resorption aus dem Kniegelenk war jedoch bei einem 20 min-Wert von $38,4 \pm 6,3\%$ gegenüber $20,5 \pm 3,2\%$ beim nicht vorbehandelten Tier mit einem P von 0,001 signifikant verzögert (s. Abb. 24). Am zweiten Tage nach der Ölinjektion war das Allgemeinbefinden der Tiere sichtlich beeinträchtigt, ihre Freßlust vermindert, die Atmung erheblich beschleunigt. Die Resorption war 20 min nach Injektion der Testlösung bei einem Wert von $43,8 \pm 5,6\%$ gegenüber dem Vortage weiter verzögert.

Am dritten Tage nach der Crotonölinjektion starben zwei Tiere dieser Gruppe. Die Obduktion ergab eine massive hämorrhagisch-eitrige Pleuritis rechts bei einem hämorrhagischen, mit Öl untermischten Pleura-

erguß von etwa 5 cm^3 . Die rechte Lunge war weitgehend kollabiert. Herzbeutel, Herz und Mediastinum boten keinen pathologischen Befund.

Am vierten Tag nach der Crotonölinjektion durchgeführte Versuche mit den restlichen zwei Tieren dieser Gruppe ergaben 20 min-Werte von $44,1\%$ und $40,0\%$, also eine Verzögerung der Resorption in annähernd gleicher Größe wie am zweiten Tag nach der intrapleurale Ölinjektion. Am fünften Tage starb ein weiteres Tier. Ein mit dem letzten Tier dieser Gruppe am sechsten Tage durchgeführter Versuch ergab einen Wert von $50,2\%$ 20 min nach intra-artikulärer Injektion der Testlösung. Das Tier starb 10 min nach Beendigung des Versuches.

Diese Ergebnisse stimmen mit den von EDLUND (1949) bei der bakteriellen Fernentzündung gewonnenen Resultaten überein. Sie zeigen, daß eine Crotonölpleuritis das Stratum synoviale im Sinne einer Resorptionsverzögerung zu beeinflussen vermag, und zwar schon zu einem Zeitpunkt, in dem der Aspekt der Tiere noch völlig unauffällig ist. Eine Erklärung für diese Verzögerung zu geben ist schwierig. Ob es sich um eine Auswirkung der aus den Entzündungsgebieten durch den Gewebszerfall freigesetzten und resorbierten Histaminsubstanzen (EDLUND) handelt, die über eine Gefäßdilatation im Stratum synoviale zu einer Resorptionsverzögerung führen, kann nur vermutet werden. Es muß weiter an eine periphere Kreislaufinsuffizienz und eine Umstellung des Kreislaufs im Sinne einer Zentralisation (DUESBERG und SCHRÖDER 1944) durch die freigesetzten und resorbierten Histaminsubstanzen gedacht werden. Wenn auch das eigentliche, an den Gefäßen des Stratum synoviale durch die Fernentzündung provozierte

Geschehen mit dieser Methodik nicht erfaßt werden kann, so dürften diese Ergebnisse doch in Übereinstimmung mit den Befunden EDLUNDS (1949) als gültiger Beweis dafür angesehen werden, daß eine unspezifische, an irgendeiner Stelle des Organismus ablaufende Entzündung den Resorptionsmechanismus des Stratum synoviale stören kann.

9. Der Einfluß der unspezifischen und der allergisch-hyperergischen Arthritis auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale

Von grundlegender Bedeutung für den Ausgang einer Arthritis ist, abgesehen von Art und Massivität der Infektion bzw. Stärke und Ausdehnung der rheumatischen Veränderungen, die Resorptionsfähigkeit des entzündlich veränderten Stratum synoviale. Seine Hauptaufgabe dürfte darin bestehen, das entzündliche Exsudat möglichst schnell und vollständig zu resorbieren. Gelingt dies nicht, dann kommt es über ein Granulationsgewebe zu einer Organisation mit bindegewebiger Umwandlung des Ergusses (bindegewebige Verwachsungen der Gelenkenden, Schädigung des Gelenkknorpels, degenerative Knorpelerkrankungen auf dem Boden einer narbigen Umwandlung des Stratum synoviale, Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Gelenkes). Diese Veränderungen können zur völligen Ankylose der Gelenke führen (KLINGE 1933, allergisch hyperergische Arthritis des Kaninchens).

Während die Folgezustände einer solchen Gelenkerkrankung und ihre histologischen Veränderungen weitgehend bekannt sind, wissen wir über die Pathophysiologie der Resorptionsverhältnisse in einem derart entzündeten Gelenk nur sehr wenig. Die bisher durchgeführten vereinzelten Untersuchungen wurden zum größten Teil mit sehr groben Methoden vorgenommen und geben keinen Aufschluß über die Resorptionsfähigkeit des entzündlich veränderten Stratum synoviale.

Die von uns angegebene sehr empfindliche Methode ermöglichte es nun, außer der Resorptionsfähigkeit auch den Ablauf der Resorption in verschiedenen Stadien einer Entzündung zu prüfen, insbesondere zu untersuchen, ob und wie sich die Resorption und deren Ablauf je nach Art der induzierten Entzündung änderte. Auf Grund der bisherigen Ergebnisse, war eine Resorptionsverzögerung zu erwarten.

Zur Klärung dieser Fragen führten wir folgende Versuche durch:

a) Die Resorption aus der Gelenkhöhle bei der unspezifischen Arthritis. Bei vier Kaninchen wurde durch Injektion von 0,5 cm³ einer 1 %igen Formalinlösung jeweils in das linke Kniegelenk eine Arthritis erzeugt. Die Resorption wurde 24 Std, 4 Tage, 7 Tage und 12 Tage nach der Formalininjektion geprüft.

Bei acht weiteren Kaninchen wurde auf die gleiche Art beiderseits eine Arthritis des Kniegelenkes erzeugt. Je zwei dieser Tiere wurden zum gleichen Zeitpunkt an dem bei den anderen Tieren die Resorption geprüft wurde, durch Nackenschlag getötet, die Gelenke entnommen, in 10%igem Formalin fixiert und nach der Fixation die Gelenkkapsel mit dem Stratum synoviale abpräpariert und in Paraffin eingebettet. Stufenschnitte, Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Die Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse:

24 Std nach der intraartikulären Formalininjektion sind die Gelenke verdickt und gerötet. Die Tiere schonen die Gelenke. Leichter Druck ist schmerzhaft. Die Injektion der Testlösung wird reaktionslos hingenommen. 20 min

nach der Injektion der radioaktiven Lösung ist die Aktivität über dem Gelenk im Mittel auf $59,4 \pm 5,2$ gegenüber $20,5 \pm 3,2\%$ beim Normaltier abgefallen. Die Resorption ist bei einem P von kleiner als 0,001 signifikant verzögert (Abb. 25).

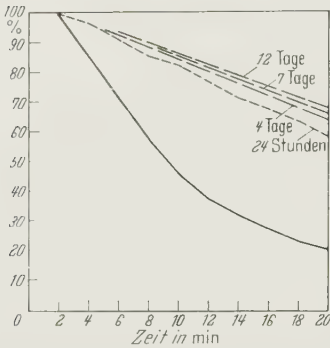


Abb. 25. Vergleich der Mittelwerte bei Formalinarthrit mit der Normalkurve. — Normalkurve

Die Gelenke der Kontrolltiere zeigten Folgendes:

Bei ihrer Eröffnung entleert sich reichlich dünnflüssige, stark blutige Flüssigkeit. Die ganze Innenfläche der Gelenke ist hochrot. Der Gelenkknorpel ist glatt und spiegelnd. Im Bereich der Zotten ist der Synovialzellbelag aufgelockert. Ein Teil der in oder unter der Synovialzellschicht gelegenen Kapillaren ist nekrotisch und in ein homogenes, strukturloses, eosinophiles Band umgewandelt. In allen Schichten des Stratum synoviale finden sich größere und kleinere Petechien. Vorwiegend im Bereich der Fettpolster fehlt der Überzug aus Synovialzellen. An ihrer Stelle findet sich ein teils dünnes, teils breiteres homogenes, eosinophiles Band, das relativ scharf gegenüber der unter ihm liegenden Fettschicht abgegrenzt ist, und in dem vereinzelte Synovialzellen mit pyknotischen Kernen zu erkennen

sind. Auch in den tieferen Lagen der Fettpolster findet man einzelne homogenisierte Gefäße ohne Wandstruktur mit teilweise mäßiger lymphozytärer Infiltration der Nachbarschaft.

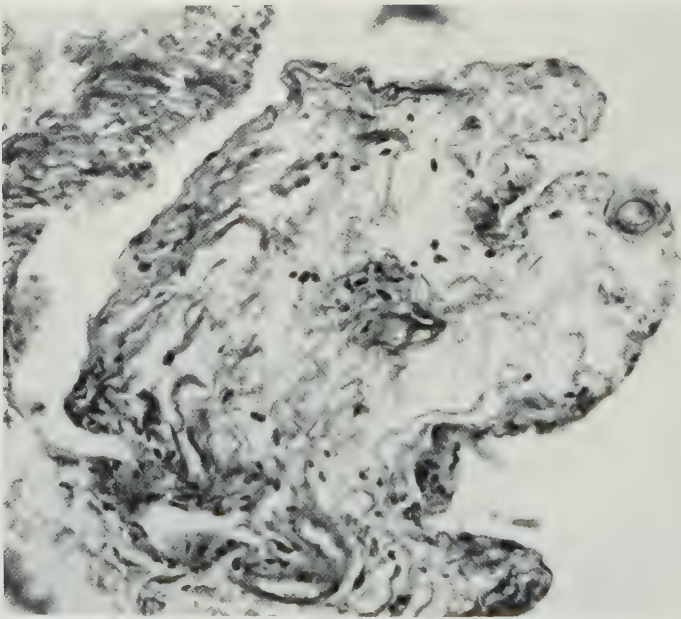


Abb. 26. Synovialzotte 4 Tage nach intraartikulärer Injektion von $0,5 \text{ cm}^3$ einer 1%igen Formalinlösung. Beschreibung s. Text

Die entzündliche Infiltration ist insgesamt gering und beschränkt sich auf wenige diffus verstreute Lymphocyten. Alle Gefäße, insbesondere die noch erhaltenen Kapillaren der Synovialzellschicht sind erweitert und prall mit Blut gefüllt.

Am 4. Tage nach der Formalininjektion ist der äußere Aspekt der Gelenke nur mäßig verändert. Schwellung und Rötung sind etwas geringer. Die Resorption

ist 20 min nach Injektion der Testlösung mit einem Mittelwert von $64,2 \pm 5,3\%$ gegenüber dem Normaltier bei einem P von kleiner als 0,001 signifikant verzögert, jedoch ist die Resorptionsverzögerung gegenüber dem 24 Std-Wert mit $59,4 \pm 5,2\%$ gering (s. Abb. 25).

Bei den Kontrolltieren dieser Gruppe findet sich fast der gleiche Befund wie nach 24 Std. Es entleert sich bei der Eröffnung der Gelenke etwas weniger dünnflüssiges, nur noch leicht blutiges Material. Die Innenfläche der Gelenkkapsel ist weiterhin hochrot. Die Knorpelflächen sind glatt und spiegelnd. Histologisch zeigen sich nur geringe Unterschiede zur vorherigen Gruppe. Während vorher fast ausschließlich der Synovialzellbelag der Fettzotten betroffen war, findet man nun auch einzelne Zotten mit einem homogenen Bandüberzug an Stelle der Synovialzellschicht. Die Homogenisierung der Synovialzellschicht reicht im Bereich der Fettpolster etwas weiter in das unterliegende Fettgewebe hinein. An einzelnen Stellen findet man eine mäßige Aktivierung der unter diesem Band liegenden Bindegewebszellen und eine mäßige lymphocytäre Reaktion. In den Fettpolstern erkennt man diffus verstreut kleine homogenisierte Bezirke, meist um ein kleines homogenes Gefäß ohne jegliche entzündliche Reaktion. Hie und da findet man diffus über das ganze Stratum synoviale verstreut Lymphozyten, Plasmazellen und einzelne Granulozyten (Abb. 26).

Sieben Tage nach intraartikulärer Formalininjektion ist das Gelenk nur noch mäßig verdickt. Die Haut ist blaß und zeigt eine leichte kleinlamelläre Schuppung.

Die Resorption ist 20 min nach Injektion der Testlösung bei einem Mittelwert von $65,3 \pm 5,2\%$ signifikant gegenüber der Norm verzögert, hält sich aber in etwa der gleichen Höhe wie bei den Tieren 4 Tage nach Formalininjektion (s. Abb. 25).

Der histologische Befund hat sich kaum verändert. An einzelnen Stellen der Fettpolster ist wieder ein Synovialzellbelag mit runden bis ovalen epithelähnlichen Zellen mit basophilem Zytoplasma und rundem chromatinreichem Kern zu sehen. Die Aktivierung der Bindegewebelemente unter der homogenen ehemaligen Synovialzellschicht ist deutlicher ausgeprägt. Es finden sich an den Stellen, an denen sich ein neuer Zellbelag bildet, plasmareiche spindelige Zellen mit ovalem hellem Kern, deren Achse senkrecht oder schräg zum Gelenklumen steht und deren Zellfortsätze stellenweise einen endothelartigen Oberflächenbelag bilden. Um die geschädigten Gefäße der Fettpolster aber auch der Zotten ist eine etwas verstärkte Rundzellinfiltration gegenüber der vorherigen Gruppe zu erkennen (s. Abb. 27 und 28).

Am 12. Tage nach der Formalininjektion ist die Resorption mit $66,8 \pm 5,4\%$ gegenüber einem 20 min-Wert von $20,5 \pm 3,2\%$ beim Normaltier signifikant

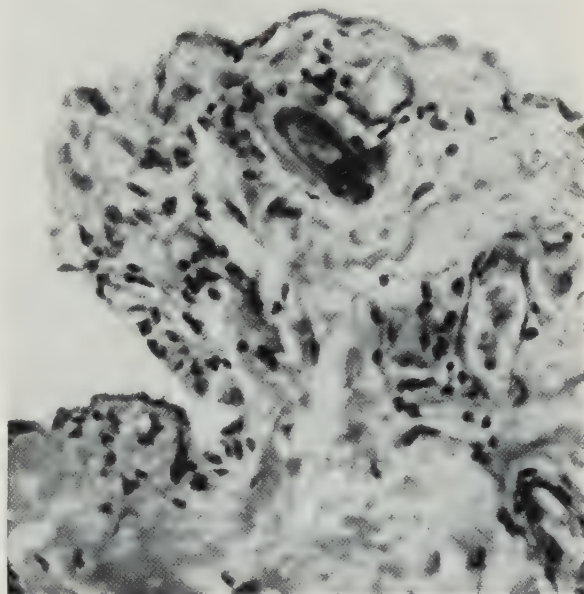


Abb. 27. Synovialzotte 7 Tage nach intraartikulärer Injektion von 0,5 cm³ 1%iger Formalinlösung. Abbm.: 180:1.
Beschreibung s. Text

(P kleiner als 0,001) verzögert, jedoch nicht signifikant gegenüber der Gruppe 4 Tage ($64,2 \pm 5,3\%$) und 7 Tage ($65,3 \pm 5,2\%$) nach der Formalininjektion.

Makroskopisch findet man bei den Tieren der Kontrollgruppe bei der Eröffnung der Gelenke keinen pathologischen Befund. Die Innenfläche der Gelenke ist blaß. Es findet sich wenig fadenziehende Synovia bei glattem, blassem Gelenkknorpel. Jedoch erkennt man vorwiegend im Bereich der Fettpolster, umschriebene kleine, runde Bezirke mit vermehrter zelliger Reaktion, die der Lage nach den vorher beobachteten homogenen Partien entsprechen dürften. Neben jungen Bindegewebszellen findet man hier Lymphozyten, Plasmazellen und wenige Granulozyten.

Während sich um einzelne Gefäße mit homogener, eosinophiler, strukturloser Wand mehr oder weniger breite Mäntel aus runden Zellen finden, sind andere, bei gleicher Wandverände-

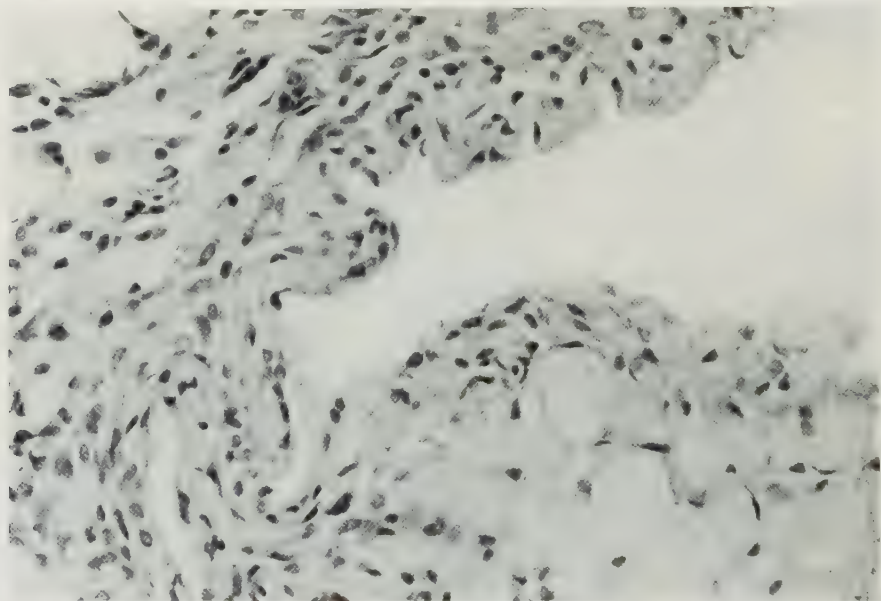


Abb. 28. Synovialzellschicht 7 Tage nach intraartikulärer Injektion von $0,5 \text{ cm}^3$ 1%iger Formalinlösung. Abbm.: 210:1. Beschreibung s. Text

rung, mit einem flachen, oft mehrschichtigen Endothelbelag ausgekleidet, der verschiedentlich auch als zartes Netzwerk das Lumen ausfüllt. Im Bereich der Zotten ist der homogene eosinophile Belag größtenteils geschwunden. An seiner Stelle findet sich ein lockeres Gewebe aus spindeligen plasmareichen Zellen mit chromatinreichem Kern, das keinen eigentlichen Zellbelag bildet, sondern aus dem lockeren Zottenbindegewebe entsteht. Im Bereich der Fettpolster ist der immer noch über große Strecken sichtbare homogene Belag aufgelockert. In ihn wandern aus dem unterliegenden Bindegewebe die gleichen wie oben beschriebenen Zellelemente ein. Hier findet man auch einzelne Riesenzellen mit leicht basophilem Zytoplasma und bis zu fünf runden chromatinreichen Kernen. Vereinzelt sieht man diese Riesenzellen auch am Rand der beschriebenen Rundzellinfiltrate in den Fettpolstern.

b) Die Resorption aus der Gelenkhöhle bei der allergisch-hyperergischen Arthritis. Drei Kaninchen wurden durch dreimalige intraperitoneale Injektion von jeweils 1 cm^3 inaktiviertem Pferdeserum im Abstand von 3 Tagen sensibilisiert. 21 Tage nach der letzten sensibilisierenden Injektion wurden die Tiere dem Versuch unterworfen. Die Versuchsanordnung war die vorher beschriebene, nur mit dem Unterschied, daß die Tiere mit Veronalnatrium narkotisiert waren. Die Resultate müssen dementsprechend mit den Ergebnissen verglichen werden, die bei Tieren mit Veronalnatriumnarkose gewonnen wurden. Durch intraartikuläre Injektion von $0,5 \text{ cm}^3$ Pferdeserum wurde bei diesen Tieren eine allergisch-hyperergische Arthritis erzeugt und die Resorption

- a) zusammen mit der Seruminjektion,
- b) 24 Std nach der Seruminjektion,
- c) 6 Tage nach der Seruminjektion

geprüft.

Sechs weitere Kaninchen wurden auf die gleiche Art sensibilisiert. 21 Tage nach der letzten sensibilisierenden Injektion wurde bei allen Tieren rechtes und linkes Kniegelenk mit $0,5 \text{ cm}^3$ Pferdeserum reinjiziert. Je zwei dieser Tiere wurden jeweils zum Zeitpunkt des Resorptionsversuches durch Nackenschlag getötet. Die Gelenke wurden entnommen, in 10% Formalin fixiert und wie die der Formalinkontrollgruppe histologisch untersucht.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Bei der Injektion der Testlösung zusammen mit der Serumreinjektion (es wurden $0,5 \text{ cm}^3$ Serum mit $0,3 \text{ cm}^3$ Testlösung gemischt) war die Resorption ge-

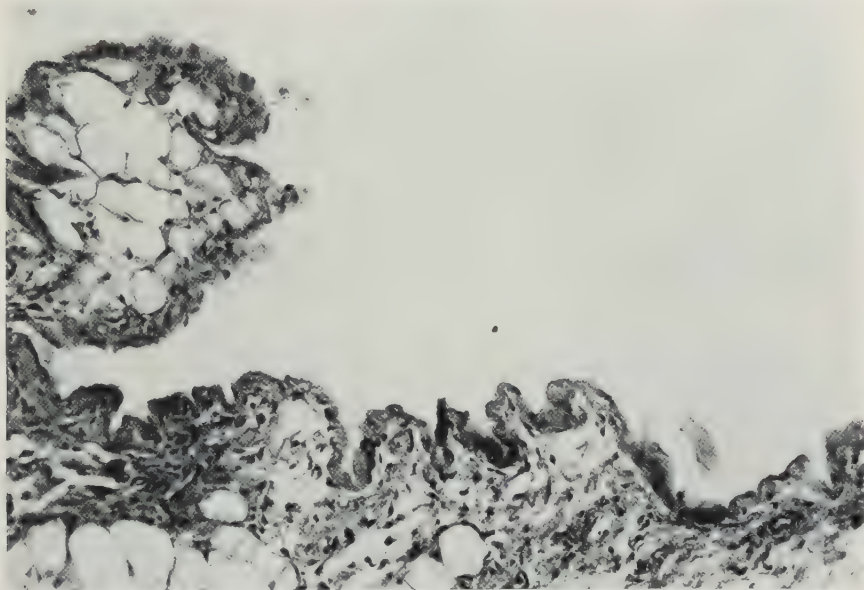


Abb. 29. Synovialzellschicht 12 Tage nach intraartikulärer Injektion von $0,5 \text{ cm}^3$ 1%iger Formalinlösung. Abbm.: 100:1. Beschreibung s. Text

messen am Aktivitätsabfall über dem Gelenk mit einem Wert von $54,8 \pm 4,2\%$ gegenüber $33,5 \pm 11,4\%$ bei der Veronalnatriumgruppe mit einem P von 0,01 signifikant verzögert. Ein Vergleich der Normalkurve mit der bei Serumreinjektion gewonnenen Kurve (s. Abb. 30) ergibt zwar eindeutig eine signifikante Verzögerung der Resorption des gleichzeitig mit dem Serum injizierten radioaktiven Mittels, doch kann hieraus nicht sicher geschlossen werden, daß es sich um eine Resorptionsverzögerung auf der Grundlage einer Antigen-Antikörperreaktion handelt und zwar aus folgenden Gründen:

1. Aus Gründen der Methodik waren wir gezwungen, eine um $0,5 \text{ cm}^3$ größere Injektionsmenge gegenüber der normalen Menge von $0,3 \text{ cm}^3$ zu nehmen. Abgesehen von den möglichen Spannungsänderungen an der Gelenkkapsel und dadurch bedingten reaktiven Änderungen der Durchblutung des Stratum synoviale fehlen auch die nötigen Vergleichswerte mit der gleichen Injektionsmenge beim Normaltier.

2. Das injizierte Serum kann als „Fremdkörper“ und nicht als Antigen bei direktem Kontakt mit dem Stratum synoviale zu einem Fremdkörperreiz und einer Durchblutungsänderung Anlaß sein.

Die angeführten Gründe sind jedoch ebensowenig ein Beweis gegen die Annahme, daß die Resorptionsverzögerung bedingt ist durch eine Durchblutungsstörung des Stratum synoviale auf dem Boden einer Antigen-Antikörperreaktion am Gefäßsystem. Auch die histologische Untersuchung der Kontrollgelenke ergab keine Klärung der Frage, ob die Resorptionsverzögerung durch das Serum als Fremdkörper oder Antigen bedingt war. Es fand sich in allen Schichten des Stratum synoviale eine erhebliche Hyperämie der Gefäße 20 min nach der Seruminjektion, deren Ursache durch beide Reaktionen bedingt sein kann.

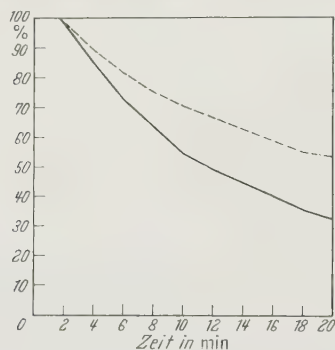


Abb. 30. Vergleich der Mittelwerte der bei Seruminjektion gewonnenen Kurve mit der Normalkurve. — Normal, ---- Reinjektion. Beschreibung s. Text

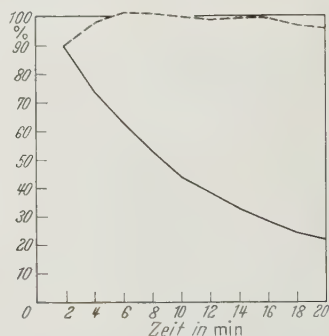


Abb. 31. Vergleich der Mittelwerte der 24 Std nach der Serumreinjektion gemessenen Werte mit denen der Normalkurve. — Normal, ---- 24 Std nach der Reinjektion

24 Std nach der Reinjektion in die Gelenke boten diese jedoch ein völlig anderes Bild. Die Gelenke waren verdickt, hochrot und druckempfindlich. Die Tiere schonten die Gelenke. Die Resorption der Testlösung war fast völlig gesperrt (Abb. 31). 20 min nach Injektion der Testlösung lag der Meßwert über dem Gelenk im Mittel bei 107% bei einem ersten Meßwert von 100% 2 min nach der intraartikulären Injektion der Testlösung. Der Kurvenverlauf zeigt die gleichen charakteristischen Eigenschaften, wie sie nach Injektion des Testmittels beim toten Tier bzw. mit oder nach Adrenalininjektion zu sehen waren. Jedenfalls kann aus den Meßwerten und dem Kurvenverlauf mit Sicherheit geschlossen werden, daß das Stratum synoviale 24 Std nach intraartikulärer Reinjektion eine in das Gelenk injizierte wäßrige Lösung nicht mehr resorbieren kann. Eine so hochgradige Resorptionsstörung setzt massive Veränderungen am örtlichen Kreislauf bzw. Gefäßsystem voraus, ausgelöst durch die Reinjektion. Das histologische Bild der Kontrollgelenke zeigt, daß das gesamte Stratum synoviale schwerst verändert ist.

Die innere Synovialzellschicht fehlt völlig. Ganz vereinzelt erkennt man an einigen Zotten noch einzelne schlanke, an Endothel erinnernde Zellen. Das Zottenstroma und das subsynoviale Gewebe, teilweise bis tief in die benachbarte Muskulatur hineinreichend, ist hochgradig ödematös aufgelockert und diffus mit Granulozyten durchsetzt (s. Abb. 32). Es finden sich ausgedehnte Blutextravasate im Zottenstroma und dem subsynovialen Gewebe, ferner erhebliche Veränderungen der Gefäßwände. Die in den Zotten unter der inneren Synovialzellschicht gelegenen Kapillaren sind, soweit noch erhalten, dilatiert und massiv

hyperämisch. Der größte Teil ist nekrotisch und nur noch nach Lage und Form zu erkennen. Die größten Veränderungen finden sich an den Gefäßen der subsynovialen Schicht. Vor-

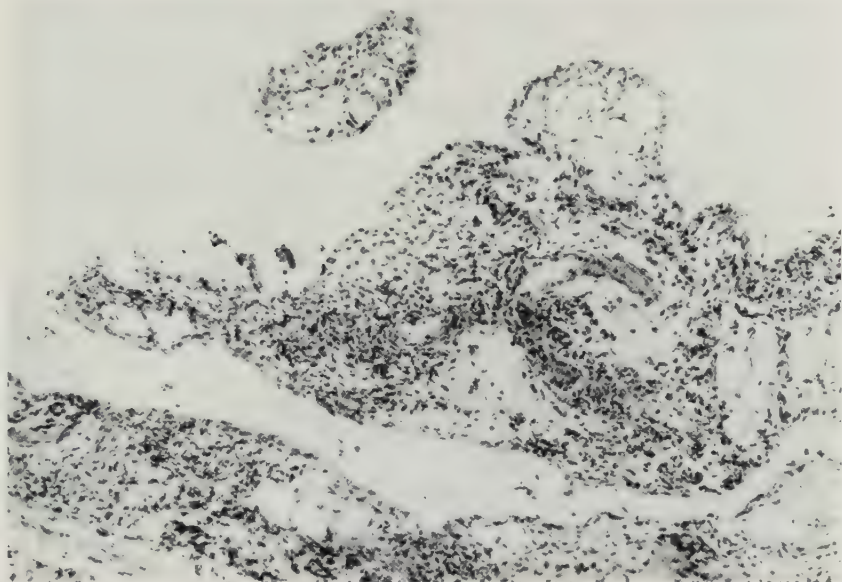


Abb. 32. Synovialzotte 24 Std nach Reinjektion von 0,5 cm³ Pferdeserum. Beschreibung s. Text

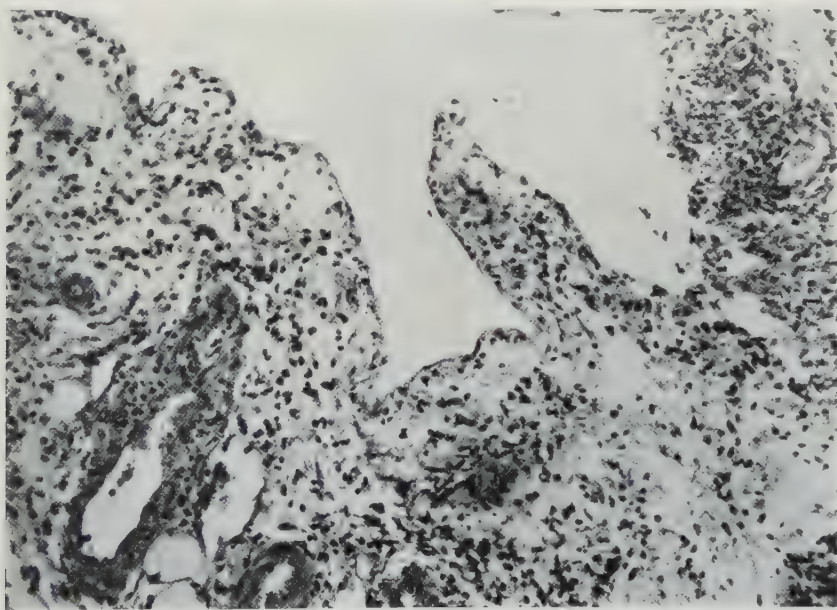


Abb. 33. Stratum synoviale 24 Std nach Reinjektion von 0,5 cm³ Pferdeserum in das Gelenk. Beschreibung s. Text

wiegend sind Venen und Arteriolen betroffen, während die Arterien nur selten Veränderungen zeigen. Die Befunde sind in ihrer Massivität sehr unterschiedlich. Teilweise sind die Gefäßwände aufgelockert und gering granulocytär infiltriert, während andere eine völlige Zerstörung

der gesamten Gefäßwand zeigen. In diesem Falle sind die Wandelemente dissoziiert und von Granulozyten durchsetzt, so daß von einer eigentlichen Gefäßwand nicht mehr gesprochen werden kann. Diese Veränderungen gehen so weit, daß schließlich nur noch eine ringförmig angeordnete Nekrose mit Kerntrümmern und Granulozyten zu sehen ist (s. Abb. 33).

Am 6. Tage nach der intraartikulären Reinjektion findet man sowohl bezüglich der Resorption als auch der Struktur völlig andere Verhältnisse. Die Gelenke sind zwar noch verdickt und gerötet, jedoch nicht mehr so stark, wie 24 Std nach der Reinjektion. Die Resorption hat sich gegenüber 24 Std nach der Reinjektion weitgehend normalisiert, ist jedoch im Vergleich zum Normaltier mit einem 20 min-Wert von $55,3 \pm 3,5\%$ zu $33,5 \pm 11,4\%$ noch erheblich verzögert (s. Abb. 34).

Das histologische Bild unterscheidet sich weitgehend von dem, das man 24 Std nach der Reinjektion feststellen kann.

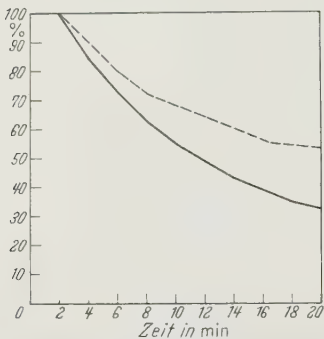


Abb. 34. Vergleich der Mittelwerte der 6 Tage nach Reinjektion gewonnenen Meßwerte mit der Normalkurve. — Normal, ---- 6 Tage nach der Reinjektion

Die diffuse granulozytäre Infiltration fehlt völlig. Stattdessen findet sich eine Infiltration der inneren Synovialpartien vorwiegend mit Lymphozyten und Plasmazellen bei geringer Reaktion der ortsständigen Bindegewebszellen. Die vorher in oder direkt unter der Synovialzellschicht gelegenen Kapillaren sind in homogene, eosinophile Bänder bzw. Ringe umgewandelt. Lumina sind nicht mehr zu erkennen (s. Abb. 35). An einzelnen Stellen findet sich wieder ein Belag mit vorwiegend flachen, teilweise aber auch rundlichen Synovialzellen, die offensichtlich von den mobilisierten ortsständigen Bindegewebszellen gebildet werden. Die meisten Arterien des subsynovialen Gewebes umgeben dicke Zellmäntel aus Lymphozyten, Plasmazellen und jungen Bindegewebszellen bei teils erhaltener, teils aufgelockerter Gefäßwand. Vereinzelt finden sich Arterien mit dem Bild einer voll ausgeprägten Arteriitis (Abb. 36). Vor allem in den Fettpolstern findet man neben umschriebenen Nekrosen eine Proliferation jugendlicher Bindegewebelemente. Während der größte Teil der Venen außer einem mehr oder weniger breiten Zellmantel aus Lymphozyten und Plasmazellen keine Veränderungen zeigt, finden sich vereinzelt durch junges Bindegewebe obliterierte Venen.

Besprechung der Ergebnisse. Unsere Versuchsergebnisse am entzündeten Gelenk zeigen, abgesehen von den durch die Art der Entzündung bedingten Unterschieden, daß die Resorptionsfähigkeit eines entzündlich veränderten Stratum synoviale zu jedem Zeitpunkt der Entzündung im Sinne einer Resorptionsverzögerung verändert ist. Die Befunde stehen im Widerspruch zu denen von DEMEL (1927) und ROSTOCK (1929), die eine Beschleunigung der Resorption von NaJ bzw. KJ aus entzündlich veränderten Gelenken fanden (gemessen am ersten Auftreten des resorbierten Jods im Speichel oder Urin), und denen von RHINELANDER u. Mitarb. (1939), die eine Beschleunigung der Resorption von Mecholyl aus entzündlich veränderten Gelenken, gemessen an der Blutdruckwirksamkeit der resorbierten Substanz, beobachteten. NOETZEL (1906), MÜLLER und LAUBER (1932) dagegen beobachteten bei bakterieller Entzündung der Gelenke oder nach Injektion von Toxinen keinen Unterschied in der Resorption zwischen entzündeten und nicht entzündetem Gelenk, gemessen am Auftreten der ersten Krankheitssymptome beim Versuchstier. Diese Ergebnisse können wegen der groben Methodik und der entsprechenden Fehlerquellen nicht als

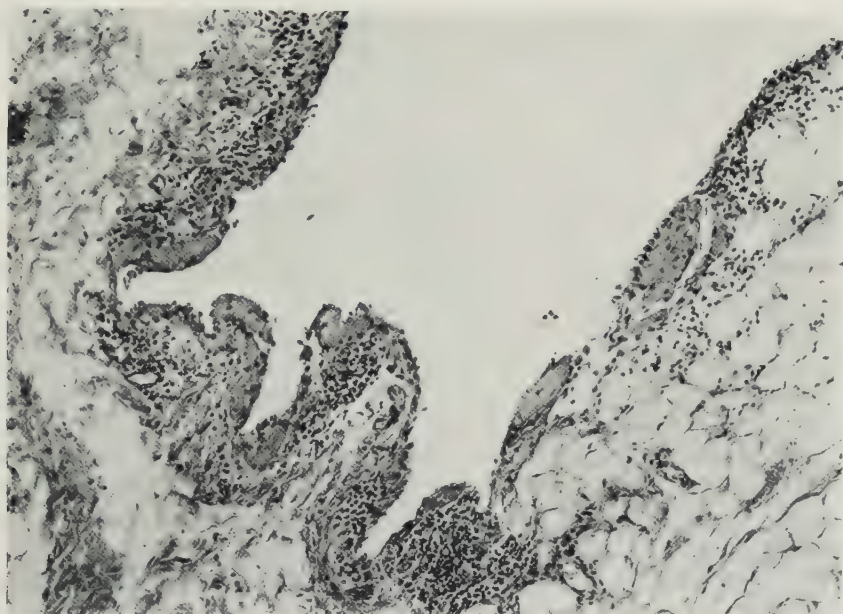


Abb. 35. Stratum synoviale 6 Tage nach intraartikulärer Reinjektion von 0,5 cm³ Pferdeserum.
Beschreibung s. Text

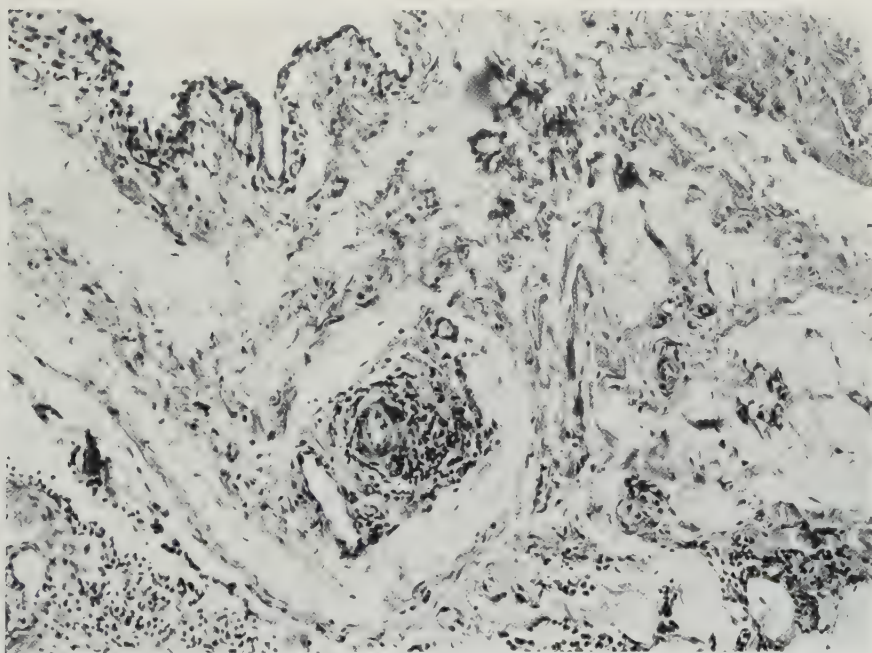


Abb. 36. Stratum synoviale 6 Tage nach intraartikulärer Reinjektion von 0,5 cm³ Pferdeserum.
Beschreibung s. Text

beweisend angesehen werden. Sie besagen lediglich, daß auch aus entzündeten Gelenken Stoffe resorbiert werden.

Unsere Befunde bestätigen jedoch die Ergebnisse EFSKINDS (1941), der die Resorption einer wäßrigen Lösung von Perabrodil und Indigocarmin bei der artefiziellen Arthritis des Kaninchens untersuchte. Der Autor fand, daß die Resorption aus dem Gelenk zu keinem Zeitpunkt der Entzündung gesteigert war. Sie war im Gegenteil, wie auch wir es bei Hyaluronidase, Formalinarthritis und allergisch-hyperergischer Arthritis beobachten konnten, parallel mit Zu- bzw. Abnahme der Entzündung mehr oder weniger erheblich verzögert. Wir wiesen schon bei der durch Hyaluronidase induzierten Entzündung daraufhin, daß die Resorptionsverzögerung aus dem Entzündungsgeschehen, der daraus resultierenden Gefäßreaktion und ihrer sekundären Auswirkung auf das Gewebe zu erklären ist. CHAMBERS und ZWEIFACH (1940, 1944, 1946) beobachteten, daß eine entzündliche Hyperämie mit einer Erweiterung der Metarteriolen einhergeht. Die präkapillaren Sphinkteren sind gelähmt, es kommt zu einem Stillstand der Vasomotion, schließlich zur Stase und zum Austritt zuerst von flüssigen, dann corpuskulären Blutbestandteilen. Die Arteriolen sprechen nicht mehr auf sympathische Nervenreize an. Die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße ist jederzeit nachweisbar, wenn man während einer Entzündung Evans-Blue injiziert. Der Farbstoff tritt an den Stellen, an denen eine Entzündung abläuft, aus den Gefäßen aus. Wir wiederholten bei Kontrolltieren mit Formalinarthritis und allergisch-hyperergischer Arthritis diese Versuche mit Trypanblau. Es tritt immer an den alterierten Stellen Farbstoff aus und zwar, mit unbewaffnetem Auge sichtbar, nur an den entzündeten Stellen.

Dabei fällt auf, daß bei der allergisch hyperergischen Arthritis die Blaufärbung der Gelenke immer intensiver ist als bei der Formalinarthritis. Es handelt sich also um zwei grundsätzlich verschiedene Entzündungsformen. Das findet auch seine Bestätigung im morphologischen Bild und — hier erstmals in Form einer Kurve erfaßt — in der Störung der Resorptionsfähigkeit je nach Art und Grad der Entzündung. Abgesehen davon, daß es bei jeder Entzündung zu von der Norm abweichenden Durchblutungs- und dementsprechend Resorptionsverhältnissen an den Kapillaren kommt, muß es auch je nach Art und Grad der Entzündung zu unterschiedlicher Exsudation und zu einer Änderung der Diffusion durch das Gewebe zu den resorbierenden Kapillaren kommen. Die Ergebnisse McMASTERS (1946) zeigen, daß beim entzündlichen Ödem kein für das Gewebe typischer „Breachpunkt“ vorhanden ist. Der Einstrom von Flüssigkeit ist dem angewandten Druck direkt proportional. Die Homogenität des Grundgewebes wird durch die aus den Kapillaren austretende Flüssigkeit zerstört, die normalerweise perifibrillären Flüssigkeitsfilme werden in Flüssigkeitsräume umgewandelt. Erst aus der Kombination der beiden Faktoren Durchblutungsstörung und Diffusionsstörung ergibt sich die beobachtete Änderung der Resorption.

Betrachtet man an Hand des Kurvenverlaufs die Resorptionsverhältnisse und vergleichend das histologische Bild der jeweiligen Entzündung, dann ist daraus hinsichtlich der Entzündungsentstehung folgendes abzuleiten: Eine Injektion von Formalin in ein Gelenk führt über eine Koagulationsnekrose der oberflächlichen, weniger der tiefer gelegenen Gewebsschichten, zu einer reaktiven Entzündung. Die Reaktion des Gefäßsystems ist sekundär. Man beobachtet Hyperämie, Petechien und mäßiges Ödem als Ausdruck einer Gefäßinnervations-

störung, jedoch ohne massive entzündliche Exsudation, wie wir es bei der allergisch hyperergischen Arthritis sehen. Der einmal durch das Formalin gesetzte Gewebsschaden wird langsam, vorwiegend aus ortsständigen Zellelementen, repariert. Die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale ist infolge Durchblutungsstörung und Diffusionsänderung fast gleichbleibend über Tage gestört. Völlig andere Verhältnisse finden sich bei der allergisch-hyperergischen Arthritis. Die nach KLINGE (1933) als Hauptcharakteristikum der allergisch hyperergischen Reaktion anzusehende vaskuläre Komponente in Form einer erheblichen Irritation des Endstrombahngebietes, morphologisch erfaßbar durch flächenhafte Blutungen, Stase und Prästase im Kapillargebiet und massiver Exsudation, äußert sich im Verlauf der Resorptionskurve. Man erkennt, daß 24 Std nach Auslösung der allergisch-hyperergischen Reaktion die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale fast völlig aufgehoben ist. Dies dürfte, wie die histologische Untersuchung zeigt, größtenteils durch die aus der Reaktion resultierende Durchblutungsstörung bedingt sein, auch wenn infolge der erheblichen Exsudation und der dadurch bedingten Änderung des Gewebsgefüges die Diffusion der intraartikulär injizierten Testlösung zu den Kapillaren hin gestört sein muß. Der nunmehr aus diesem Geschehen (Irritation des Gefäßsystems, Durchblutungsstörung und Exsudation durch die Antigen-Antikörperreaktion) resultierende Gewebsschaden führt zu einer reparativen Entzündung, die ihrerseits nach Ablauf der ersten, stürmischen Gefäßreaktion eine weitere, aus dem Kurvenverlauf ersichtliche Störung der Durchblutung zur Folge hat. Aus dem Vergleich der 24 Std nach der Reinjektion gewonnenen Kurven mit denen vom 6. Tage kann der Schluß gezogen werden, daß sich die örtlichen Kreislaufverhältnisse nach Ablauf der ersten Reaktion wieder in Richtung einer normalen Durchblutung verändern. Der Unterschied in der Art der Entzündung und ihrer auslösenden Ursache geht aus dem Kurvenverlauf klar hervor.

Besprechung

Welche Erkenntnisse vermitteln nun unsere Versuchsergebnisse bezüglich der Bedeutung des Stratum synoviale für ein Gelenk und welche Schlußfolgerungen lassen sich aus diesen Ergebnissen hinsichtlich seiner Funktion, betrachtet von der Resorptionsfähigkeit her, ziehen? Aus unseren Versuchen ist zu ersehen, daß das Stratum synoviale, eine gute Resorptionsfähigkeit besitzt. Diese Resorptionsfähigkeit kann vom großen Kreislauf (Narkose, Adrenalin), örtlich reflektorisch durch eine Entzündung der Haut über dem Gelenk, durch eine Entzündung an gelenkfernen Stellen des Körpers, durch verschiedenartig induzierte Entzündungen des Stratum synoviale selbst, d. h. immer über den Weg einer lokalen Durchblutungsänderung, beeinflußt werden. Wir wiesen schon darauf hin, daß beim Stratum synoviale Sekretion und Resorption analog dem Austausch von Flüssigkeit an der Kapillare in einem Gleichgewicht stehen müssen. Es ist mit Sicherheit anzunehmen, daß sich Sekretion und Resorption, autonom gesteuert, der durch die Funktion eines Gelenkes gegebenen physiologischen Belastung anpaßt, wie wir es von anderen Körpergebieten und Organen her kennen. Das Gelenk ist von der Funktion des Stratum synoviale, nämlich der Bildung der Synovia, und das Stratum synoviale ist über die funktionelle Belastung des Gelenkes in seiner Funktion von diesem abhängig. Eine Funktion des einen

resultiert aus der Funktion des anderen. Aus der Störung einer Funktion, vom Stratum synoviale her betrachtet seiner Resorption oder Sekretion, vom Gelenk her betrachtet seiner Bewegung, muß eine Störung der gesamten Gelenkphysiologie und bei längerem Bestehen dieser Störung ein morphologisch faßbarer Gelenkschaden resultieren.

Wir wollen abschließend versuchen, die Ansicht an Hand der bekannten Morphologie der Gelenkerkrankungen zu unterbauen.

Bei der Gicht werden die vermehrt im Blut auftretenden Urate durch das Stratum synoviale zusammen mit dem zur Bildung der Synovia benötigten Dialysat des Blutes in die Gelenkhöhle sezerniert. Sie lagern sich im Knorpel ab und führen zu direkten Knorpelschäden. Gleichzeitig jedoch erzeugen diese Urate im Stratum synoviale selbst Nekrosen und eine chronische Entzündung. Eine Entzündung des Stratum synoviale aber führt über eine veränderte Durchblutung zu einer Störung der Resorptionsfähigkeit, wie wir an Hand der durch Hyaluronidase und Formalin erzeugten Entzündung zeigen konnten. Da Resorption und Sekretion in einem Gleichgewicht miteinander stehen müssen ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß bei Verzögerung der Resorption auch die Sekretion gestört ist. Wenn auch bei der Gicht der primäre Schaden nicht direkt im Stratum synoviale gelegen ist, sondern auf einer den gesamten Organismus treffenden Stoffwechselstörung beruht, so dürften sich doch die direkte Schädigung des Knorpels durch die Urate und die gestörte Funktion des Stratum synoviale auf dem Boden von Nekrosen und chronischer Entzündung in Hinsicht auf den weiteren Verlauf der Erkrankung des *Gelenkes* summierend ergäßen. Der gleiche Mechanismus dürfte für die Ochronose anzunehmen sein.

Bei den hämorrhagischen Diathesen finden sich auf dem Boden einer allgemeinen Blutungsneigung Blutungen in den Gelenken. Damit ist primär die physiologische Zusammensetzung der Synovia gestört. Gleichzeitig jedoch bewirkt das in die Gelenkhöhle austretende Blut (Fremdkörperreiz) eine reaktive Entzündung des Stratum synoviale, die in Verbindung mit den im Stratum synoviale selbst auftretenden Blutungen zu einer Störung seiner Funktion führen muß. Man findet schließlich im Endzustand eine Fibrose und Hämosiderose des Stratum synoviale mit Vermehrung und Vergrößerung der Zotten und schwerste Knorpel- und Knochenschäden. Wenn auch bei diesem Krankheitsbild der primäre Schaden ähnlich wie bei der Gicht nicht im Stratum synoviale selbst, sondern in einer allgemeinen Blutungsneigung zu suchen ist, so dürften doch die dadurch bedingten sekundären Veränderungen im Stratum synoviale hinsichtlich des Verlaufes und des Endzustandes der Gelenkerkrankung von ausschlaggebender Bedeutung sein.

Bekanntlich treten nach Gelenktraumen innerhalb kurzer Zeit Gelenkergüsse auf, die zwar meist relativ schnell resorbiert werden, oft aber auch rezidivierend zu einer chronischen Gelenkerkrankung führen. Allein das Auftreten eines Ergusses beweist, daß es zu einer Störung des Gleichgewichtes zwischen Sekretions- und Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale gekommen sein muß, deren Ursache das Trauma ist. Die Ursache für den Erguß muß in reflektorisch durch Zerrung an der Gelenkkapsel ausgelösten Durchblutungsstörungen des Stratum synoviale gesucht werden. Die rezidivierenden Gelenkergüsse finden ihre Erklärung in einem durch das Trauma bedingten erhöhten Reizzustand des Gefäß-

systems, so daß auch geringste, sonst nicht beachtete Traumen zu einer erneuten Störung der Durchblutung und damit zu einer Störung des Gleichgewichtes zwischen Sekretion und Resorption, also zum Erguß, führen können. Auch hierbei wirkt, ähnlich wie bei den hämorrhagischen Diathesen, das ausgetretene Blut oder aus dem Erguß ausgefallene Eiweiß als *Fremdkörper* auf das Stratum synoviale und führt über eine Entzündung zu einer Beeinträchtigung seiner Funktion. Histologisch findet man in chronischen Fällen neben einer Fibrose des Stratum synoviale und einer Hämosiderose eine Vermehrung und Vergrößerung der Zotten und letztlich schwerste Knorpelschäden und Destruktionen des Gelenkes. Besonders deutlich ist die Auswirkung einer primären Erkrankung des Stratum synoviale und deren sekundäre Folgen auf das Gelenk beim Rheumatismus zu sehen. Untersuchungen von KLINGE (1933) zeigen eindeutig, daß sich eine rheumatische Erkrankung der Gelenke primär an der Gelenkkapsel und am Stratum synoviale manifestiert. Es finden sich im akuten Stadium des Rheumatismus multiple Herde in diesen Gelenkabschnitten, die beginnend mit einer fibrinoiden Verquellung des Bindegewebes über das Aschoffsche Granulom schließlich in Narbe abheilen. Es findet sich also eine rheumatische Synovitis, die, wie der Gelenkerguß im akuten Stadium zeigt, zu einer Störung des Sekretions/Resorptionsgleichgewichtes führt. Während dieses akute Bild zwar unter Hinterlassung kleiner, den Granulomen entsprechender Narben in Stratum synoviale und Gelenkkapsel ohne Folgen für das Gelenk (als funktionierende Einheit betrachtet) abheilen kann, führt der chronische Gelenkrheumatismus unter weiterem Fortschwelen der rheumatischen Entzündung und narbiger Verziehung der Kapsel und des Stratum synoviale und damit bedingtem Ausfall von funktionstüchtigem Gewebe schließlich zu schwersten Knorpel und Knochenschäden. KLINGE zeigt, daß sich die rheumatischen Herde meist in Gefäßnähe befanden, daß oft aber auch die Gefäßwand selbst und auch Nerven in den Entzündungsprozeß mit einbezogen waren. Eine derart lokalisierte Entzündung führt zwangsläufig zu einer Irritation des Gefäßsystems des Stratum synoviale, die sich besonders bei schon vorgeschädigtem Gewebe beim chronischen Rheumatismus, weiterhin auf die ohnehin schon gestörte Funktion auswirken muß. Wir konnten zeigen, daß eine allergisch-hyperergische Entzündung des Stratum synoviale, als Modell für den akuten Rheumatismus betrachtet, über eine massive Irritation des Endstrombahnnetzes zu einer völligen Resorptionssperre und, aus dieser abgeleitet, Funktionssperre des Stratum synoviale führen kann. Auch bei den eitrig entzündlichen Gelenkerkrankungen, gleichgültig ob metastatisch im Rahmen einer Sepsis oder durch direkte Infektion bei offenen Gelenkverletzungen verursacht, steht die Erkrankung des Stratum synoviale im Vordergrund. Erst über eine primäre Erkrankung dieses Gewebes kommt es je nach Massivität und Dauer der Erkrankung und ihrer Restzustände zu einer sekundären Schädigung des Gelenkes in Form von Knorpel- und Knochenschäden.

Betrachtet man aus diesem Blickwinkel die Arthrosis deformans, dann kann man feststellen, daß am Beginn der Erkrankung immer eine Schädigung des Gelenkknorpels zu stehen scheint. Eine Schädigung des Gelenkknorpels setzt jedoch, wenn man von direkten Schäden durch Urate bei der Gicht oder Ochronosepigment oder durch Traumen absieht, eine Störung der Ernährung voraus. Die Ernährung des gefäßfreien Gelenkknorpels erfolgt über eine Diffusion

der Nährstoffe einerseits aus einem Anastomosenkranz am Kapselansatz für die peripheren Teile, während die zentral gelegenen Partien durch die Synovia ernährt werden.

Die Ernährung des Knorpels ist also letztlich abhängig von der Durchblutung und damit Funktion des Stratum synoviale. Ob dabei Durchblutung und Funktion im Rahmen einer Arteriosklerose oder, wie bei der klimakterischen Arthrosis durch hormonell-vegetative Faktoren vermindert ist, oder ob eine unphysiologische Belastung des ganzen Gelenkes, wie z. B. bei Arbeiten mit Preßluftwerkzeugen, im Vordergrund steht, ist für die Genese der Erkrankung prinzipiell ohne Bedeutung. Wenn schon eine geringgradige Dermatitis in der Gelenkregion die Durchblutung des Stratum synoviale reflektorisch zu beeinflussen vermag, dann ist mit Sicherheit zu erwarten, daß die dauernden Zerrungen an der Gelenkkapsel bei Arbeiten mit Preßluftwerkzeugen zu reflektorischen Durchblutungs- und Funktionsänderungen des Stratum synoviale führen. Sie führen in Verbindung mit der unphysiologischen Belastung des Gelenkknorpels und den daraus resultierenden höheren Anforderungen bezüglich seiner Ernährung zu den am Beginn der Erkrankung stehenden Knorpelschäden. Die Tatsache, daß die Arthrosis deformans immer an Gelenken mit erhöhter funktioneller Belastung beginnt, deutet daraufhin, daß die Funktion des Stratum synoviale nicht den aus der Funktion des Gelenkes resultierenden Anforderungen entspricht.

Ist einmal die Funktion des Stratum synoviale gestört und dadurch der Gelenkknorpel geschädigt, dann resultiert eine Störung der Gelenkfunktion und über diese reflektorisch wiederum eine Beeinflussung des Stratum synoviale. Andererseits kann es bei unphysiologischer Belastung der Gelenke zu einem Mißverhältnis zwischen Funktionsfähigkeit des Stratum synoviale und den aus der Gelenkbelastung resultierenden Anforderungen an diese Funktionsfähigkeit kommen. Der funktionellen Belastung eines Organes sind durch seinen Aufbau Grenzen gesetzt. Es kann sich zwar durch eine kompensatorische Hypertrophie höheren funktionellen Belastungen in etwa anpassen. Ein gewisses Mißverhältnis zwischen Anforderung und Leistung bleibt in diesem Falle jedoch immer bestehen. Es ist dabei vom Gelenk her gesehen gleichgültig, ob primär die Funktion des Stratum synoviale auf dem Boden einer Erkrankung dieses Organes eingeschränkt wird oder ob auf Grund einer erhöhten Belastung des Gelenkes und die sich aus dieser Belastung ergebenden funktionellen Anforderungen vom funktionstüchtigen „Organ“ Stratum synoviale nicht erfüllt werden können. Es wird immer im Enderfolg eine Erkrankung aller funktionell miteinander gekoppelter Teile resultieren, erst recht dann, wenn zu einer zwar noch kompensierten Funktion des Stratum synoviale bei einer Vorschädigung durch Arteriosklerose oder eine andere schon abgeheilte Erkrankung dieses Gewebes erhöhte funktionelle Anforderungen kommen. Es sei in diesem Zusammenhang noch erwähnt, daß sich die Gelenkzotten bei allen chronischen Gelenkerkrankungen, nach Arthritiden, aber auch schon normalerweise in der postnatalen Lebensperiode vermehren. Ob es sich hierbei um eine funktionelle Anpassung des Stratum synoviale im Sinne einer kompensatorischen Hypertrophie handelt, ist eine offene Frage.

Zusammenfassung

Unsere Versuche zeigen, daß das Stratum synoviale eine gute Resorptionsfähigkeit besitzt. Eine intraartikulär injizierte wäßrige Lösung wird innerhalb

von 20—25 min in die Blutbahn aufgenommen. Durchblutung und Resorption unterliegen den gleichen vegetativ nervösen Regulationen wie in anderen Körpergebieten. Sie können durch eine Entzündung an gelenkfernen Gebieten, reflektorisch durch eine Entzündung der Haut über dem Gelenk, durch örtliche oder intravenöse Injektion von Adrenalin, durch eine Barbituratnarkose und Muskelrelaxantien im Sinne einer Verzögerung beeinflusst werden. Cortison hat am gesunden Stratum synoviale keinen Einfluß auf die Resorption.

Jede Entzündung des Stratum synoviale führt über eine Irritation des Endstrombahngebietes zu einer Resorptionsverzögerung, wobei diese von Art und Grad der Entzündung abhängig ist.

Bei einem pH von 4,6 und bei Anwendung eines bestimmten Druckes wird die Resorption durch Hyaluronidase über eine verbesserte Diffusion zum Kapillarsystem anfänglich gesteigert. Eine sekundär durch Hyaluronidase ausgelöste Entzündung jedoch, die sich in Form von Ödem, Hyperämie, petechialen Blutungen und mäßiger granulozytärer Infiltration manifestiert, verzögert die Resorption, wobei sich aber mit dem Abheilen der Entzündung wieder normale Werte einstellen.

Bei einer durch Formalin erzeugten Arthritis findet man eine oberflächliche Koagulationsnekrose der Synovialzellschicht und der in ihr liegenden Gefäße, die vom subsynovialen Gewebe langsam durch Organisation resorbiert wird. In allen Stadien dieser Entzündung, beobachtet vom 1.—12. Tage nach der Injektion, findet man eine beträchtliche, etwa in gleicher Höhe bestehenbleibende Resorptionsverzögerung.

Im Vordergrund der allergisch-hyperergischen Arthritis steht eine Gefäßalteration, die 24 Std nach Auslösung der Antigen-Antikörperreaktion zu einer Resorptionssperre führt. Zu diesem Zeitpunkt findet man bei einer hochgradigen, ödematösen Auflockerung des Synovialgewebes Gefäßwandnekrosen und eine massive granulozytäre Infiltration. Die Synovialzellschicht ist völlig abgeschilfert. Mit dem Abheilen der Entzündung nähern sich auch die Resorptionswerte wieder der Norm.

Aus den Versuchen wird der Schluß gezogen, daß im Mittelpunkt einer „Gelenkerkrankung“ eine Alteration des Stratum synoviale stehen muß, die über eine Änderung der Sekretion bzw. Resorption zu Funktionsstörungen im Gelenk führt.

Literatur

- ADKINS, E. W., and D. V. DAVIES: Absorption from joint cavity. *Quart. J. exp. Physiol.* **30**, 147—154 (1940).
- AHLSTRÖM, S., P. O. GEDDA and H. HEDBERG: Disappearance of radioactive serum albumin from joints in rheumatoid arthritis. *Acta rheum. scand.* **2**, 129—136 (1956).
- ALBERTINI, W. A.: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. 9, S. 508. Berlin: Springer 1929.
- ASHBOE-HANSEN, G.: Connective tissues. Transaction of the fifth conference 1954, S. 123.
- AYLWARD, F. X.: Chemical nature of Reynals spreading factor from mammalian testicle. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **36**, 477—481 (1937).
- Physiological properties of Reynals testicular diffusion factor. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **49**, 342—346 (1942).
- BAEDER, D. H., and J. SEIFTER: Effect of adrenalectomy and hypophysectomy in permeability of synovial membrane in rabbits. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **87**, 280—282 (1954).
- BARGMANN, W.: Capillaren und Interstitium. *Hamburger Symposium*, herausgeg. von B. BARTELHEIMER u. H. KÜCHMEISTER. Stuttgart: Georg Thieme 1955.
- Z. Zellforsch., Bd. 55

- BARNET, C. H.: Measurement and interpretation of synovial fluid viscosities. *Ann. rheum. Dis.* **17**, 229—233 (1958).
- BARTA: Zit. nach BAUMECKER.
- BAUER, W., and C. A. BENNET: Experimental and pathological studies in degenerative type of arthritis. *J. Bone Jt Surg* **18**, 1—18 (1936).
- BAUER, W., M. W. ROPES and H. WAINE: The physiology of articular structures. *Physiol. Rec.* **20**, 272—285 (1940).
- SHORT and G. A. BENNET: Manner of removal of proteins from normal joints. *J. exp. Med.* **57**, 419—433 (1933).
- BAUMECKER, H.: Untersuchungen über Veränderungen an der Gelenkkapsel und ihre Beziehungen zu den Ergüssen des Kniegelenkes. *Dtsch. Arch. klin. Chir.* **170**, 511—569 (1932).
- BENNET, G. A., and W. BAUER: Further studies concerning repair of articular cartilage in dog joints. *J. Bone Jt Surg.* **17**, 141—150 (1935).
- and M. F. SCHAFER: Passage of Protein from vascular system into joints and certain other body cavities. *J. exp. Med.* **70**, 277—291 (1939).
- BENNINGHOFF, A.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie (W. v. MÖLLENDORFF), Bd. VI, S. 17ff. Berlin 1930.
- BENSLEY, S. H.: On the presence, properting and distribution of the intercellular ground-substance of loose connective tissue. *Anat. Rec.* **60**, 93—108 (1934).
- Histological studies of reactions of cells and intercellular substances of loose connective tissue to spreading factor of testicular extracts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **52**, 983—988 (1950).
- BICHAT, X.: Traite des membranes en general et des diverses membranes en particulier. Paris: M. Husson 1799. Zit. nach SIGURDSON.
- BICK, E. N.: Surgical pathology of synovial tissue. *J. Bone Jt Surg.* **12**, 33—50 (1930).
- BILLERBECK, E.: Bedeutung des Hyaluronsäure-Hyaluronidase-Systems, pathologische und normale Vorgänge an den interzellulären Grenzflächen. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **89**, 63—66 (1952).
- BRAUN, H.: Untersuchungen über den Bau der Synovialmembran und Gelenkknorpel sowie über die Resorption flüssiger und fester Körper aus den Gelenkhöhlen. *Dtsch. Z. Chir.* **39**, 35—83 (1894).
- BRAUN-FALCO, O., u. G. WEBER: Die Beeinflussung der Penicillin-Resorption durch Hyaluronidase. *Arzneimittel-Forsch.* **2**, 77—79 (1952).
- — Der Einfluß von Hyaluronidase auf entzündliche Vorgänge der Haut. *Hautarzt* **4**, 164—168 (1953).
- BRINTON, W.: Todd's Cyclopaedia of Anat. and Physiol. London: Longman, Brown, Green. Longmans and Roberts serous and synovial membranes, Bd. IV, S. 511. 1847—1849. Zit. nach EDLUND.
- BROMAN, I.: Normale und abnormale Entwicklung des Menschen. Wiesbaden: J. F. Bergmann 1911.
- BUCCIANTO, L.: Sulla struttura della membrana sinoviale dell'uomo nelle varietà. *Arch. ital. Embr.* **433**, 281—307 (1940).
- BURKL, W., u. A. SONNENSCHN: Über Vorkommen und Verteilung der Mukopolysaccharide in der Synovialis bei Erkrankungen der Kniegelenke. *Virchows Arch. path. Anat.* **322**, 442—451 (1952).
- COBBOLD, A. F., and O. J. LEWIS: Bloodflow to knee joint of dog. Effect of heating, cooling and adrenaline. *J. Physiol. (Lond.)* **133**, 383—397 (1956).
- — Nervous control of joint blood vessels. *J. Physiol. (Lond.)* **133**, 467—471 (1956).
- CHEMNITZ, K. H., K. H. BOLTZE u. H. HOFMANN: Die Wirkung des Guajakolglycerinäther in Kombination mit Pyrazolon im Tierversuch. *Pharmazie* **12**, 391—396 (1957).
- DAUBENSPECK, K.: Innervation der Synovialmembran. *Z. Orthop.* **68**, 139—148 (1938).
- DAVIES, D. V.: Staining raktion of normal synovial membrane with special reference to origine of synovial mucin. *J. Anat. (Lond.)* **77**, 160 (1943).
- Structure and functions of synovial membrane. *Brit. med. J.* **1950 I**, 92—95.
- , and D. A. W. EDWARDS: Blood supply of synovial membrane and intraarticular structures. *Ann. roy. Coll. Surg. Engl.* **2**, 142—156 (1948).
- DAY, T.: The nature of the spreading effects occasioned by hyaluronidase in subcutaneous tissue. *Brit. J. exp. Path.* **38**, 362—429 (1957).

- DEMEL, R.: Ein tierexperimenteller Beitrag zur Gelenkinfektion. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **149**, 213—221 (1927).
- DIETRICH, A.: *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Bd. 9, I, S. 166. Berlin: Springer 1929.
- DINGLE, J. T. M., and TH. D. P. PAGE: In vitro studies on human synovial membrane. A. Metabolic comparison of normal and rheumatoid tissue. *Brit. J. exp. Path.* **37**, 318—321 (1956).
- DUESBERG, R., u. W. SCHROEDER: *Pathophysiologie und Klinik der Kollapszustände*. Leipzig: S. Hirzel 1944.
- DURAN-REYNALS, F.: Tissue permeability and the spreading factor in infection. *Bact. Rev.* **6**, 197—252 (1942).
- EDLUND, T.: Studies on absorption of colloids and fluid from rabbit knee joints. *Acta physiol. scand.* **18**, Suppl. **62**, 5—108 (1949).
- , and H. LINDERHOLT: Effect of Salyrgan (Mersalyl) on resistance to movement of fluid through synovial membranes increased permeability of this connective tissue. *Acta physiol. scand.* **21**, 250—257 (1950).
- ESKIND, L.: Experimentelle Untersuchungen über die Anatomie und Physiologie der Gelenkkapsel. Die normale und pathologische Histologie der Synovialmembran. *Acta orthop. scand.* **12**, 214—266 (1941 a).
- Experimentelle Untersuchungen über Anatomie und Physiologie der Gelenkkapsel. Die Aufsaugungsverhältnisse im Kniegelenk beim Kaninchen. *Acta orthop. scand.* **12**, 267 bis 308 (1941 b).
- Studies on the anatomy of the knee joint capsule. *Acta path. mikrobiol. scand.* **25**, 59—70 (1947).
- EHRRICH, W. E.: Die Entzündung. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. VII. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- ELSTER, S. K., M. E. FREEMAN and A. DORFMAN: Effect of hyaluronidase on passage of fluid and T 1824 through capillary wall. *Amer. J. Physiol.* **156**, 429—432 (1949).
- ENGEL, D.: Permeability of synovial membrane. *Quart. J. exp. Physiol.* **30**, 231—244 (1940).
- Influence of sympathetic nervous system on capillary permeability. *J. Physiol. (Lond.)* **99**, 161—181 (1941).
- Influence of sympathetic nervous system in traumatic shock. *J. Physiol. (Lond.)* **102**, 281—289 (1943).
- EPPINGER, H.: *Die Permeabilitätspathologie*. Wien: Springer 1949.
- ERGENBRIGHT u. LOWRY: *Zit. nach GARDNER* 1950.
- FELICE, E. A. DE, R. RICHTERICH-VAN BAERLE, R. MEGIRIAN and E. H. DEARBORN: Effect of hyaluronidase on absorption of subcutaneously administered phenol red. *Amer. J. med. Sci.* **232**, 526—567 (1956).
- FICK, R.: *Handbuch der Anatomie und Mechanik der Gelenke*. Jena 1910. *Zit. nach EFSKIND*.
- FISCHER, E.: Eine einfache Methode zur Darstellung der Lymphgefäße durch parenchymatöse Injektion von Luft. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **176**, 16—25 (1933).
- FISH, W., G. H. MILLER and CH. HUGGINS: Binding of Phenolsulfonephthalein by Tissues and the Effect of Denaturation thereon. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **72**, 558—560 (1949).
- FISK, G. R.: Hyperplasia and metaplasia in synovial membrane. *Ann. roy. Coll. Surg. Engl.* **11**, 157—163 (1952).
- FRANCESCHINI: *Zit. nach LANG* 1957.
- FRERICHS: *Zit. nach EFSKIND*.
- GARDNER, E. E.: Nerve terminals associated with knee joint of mouse. *Anat. Rec.* **83**, 401—419 (1942).
- Physiology of movable joints. *Physiol. Rev.* **30**, 127—176 (1950).
- , and R. NOER: Projection of afferent fibers from muscle and joints to cerebral cortex of cat. *Amer. J. Physiol.* **168**, 437—441 (1952).
- GIBIAN, H.: Der Beitrag des Chemikers zur Struktur und Funktionsaufklärung der mesenchymalen Grundsubstanz mit besonderer Bezugnahme auf die Hyaluronidase und ihrer Substrate. Capillaren und Interstitium. Symposium 1954 (H. BARTELHEIMER u. H. KÜCHMEISTER). Stuttgart: Georg Thieme 1955.
- Chemie, biologische Bedeutung und klinische Anwendung der Hyaluronidase. *Angew. Chem.* **63**, 105—117 (1961).

- GOODNER, K.: Effect of pneumococcus autolysates upon pneumococcus dermal infection in rabbits. *J. exp. Med.* **58**, 153—160 (1933).
- GROUMANN, A.: Combination of etc. *J. biol. Chem.* **64**, 141—160 (1925).
- HAGEN-TORN, V.: Bau und Entwicklung der Synovialmembran. *Arch. mikr. Anat.* **21**, 591—663 (1882).
- HAMMAR, J. A.: Über den feineren Bau der Gelenke. *Arch. mikr. Anat.* **43**, 266—315, 813—846 (1894).
- HARRIS, R., J. B. MILLARD and S. K. BANERJEE: Radiosodium clearance from the knee joint in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.* **17**, 189—195 (1958).
- HAYES, M. A.: Effect of prolonged local treatment with adrenocortical and sex steroids on intradermal spreading action of hyaluronidase. *Endocrinology* **53**, 646—651 (1953).
- HECHTER, O.: Studies on spreading factors. Importance of mechanical factors in hyaluronidase action in skin. *J. exp. Med.* **85**, 77—97 (1947).
- Reconstitution of dermal barrier to fluid diffusion following administration of hyaluronidase. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **67**, 343—344 (1948).
- , and E. L. SCULLY: Studies on spreading factors. Effect of serum upon hyaluronidase spreading activity. *J. exp. Med.* **86**, 19—28 (1947).
- HEINLEIN, H.: Die Bedeutung der Hyaluronidase in der Biologie und Pathologie. *Zbl. allg. spez. Path.* **85**, 339—344 (1949).
- HENDER, S.: On concentration of some sulfanilamide derivatives in different organs and tissue structures. A histopharmacological study by means of fluorescence microscopy with some aspects on possibilities of obtaining high concentrations of chemotherapeutics in certain tissues. *Acta physiol. scand. (Suppl. 29)* **10**, 1—103 (1945).
- HERREL, W. E., D. R. NICOLS and D. H. HELLMANN: Penicillin. It's usefulness, limitations, diffusion and detection, with analysis of 150 cases in which it was employed. *J. Amer. med. Ass.* **125**, 1003—1011 (1944). Correction **125**, 1202 (1944).
- HERZOG, G.: *Zit. nach GARDNER 1950.*
- HESSELT, L.: Electrophoretic investigation on synovial fluid. *Acta med. scand.* **105**, 153—159 (1940).
- HIDALGO, J., C. D. MCCLURE, J. B. HENDERSON, R. W. WHITEHEAD and C. J. SMYTH: Effect on joint permeability of adrenal cortex extract, ACTH, Cortisone, Hydroxy-Phenyl-Cinchoninic acid and hyaluronidase. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **80**, 97—101 (1952).
- HIDVEGI, E.: On finer structure and blood supply of synovial membrane with special regard to its physiological circulation. *Acta morph. Acad. Sci. Hung.* **4**, 319—330 (1954).
- , and B. KELENTEI: Increasing the permeability to antibiotics of the synovial barrier. *Acta physiol. Acad. Sci. Hung.* **5**, 521—530 (1954).
- HILDEBRANDT, O.: Entstehung des Gelenkhydrops und seine Behandlung. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **81**, 412—427 (1906).
- HILTON, J.: Rest and Pain. Cincinnati: P. W. Garfield 1891. *Zit. nach GARDNER 1950.*
- HIRSCH, H. L., H. L. PFEFFER and G. B. O'NEILL: Study of diffusion of penicillin across serous membranes of joint cavities. *J. Lab. clin. Med.* **31**, 535—543 (1946).
- HOFBAUER, L.: Zur Pathogenese der Gelenkerkrankungen. *Mitt. Grenzgeb. Med. Chir.* **3**, 71—88 (1908).
- HOLLANDER, J. L., and S. M. HORVATH: Effect of vasodilating and vasoconstricting drugs on temperature of normal and arthritic joints. *Arch. phys. Med.* **34**, 162—168 (1953).
- HOLMGREEN, H., u. O. WILANDER: Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlichschen Mastzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 242—278 (1937).
- HORSTMANN, W.: Beobachtungen zur Reaktionsweise des Gefäßsystems am Kaninchenohr bei lokaler Reizung und vegetativer Fernreizung. *Beitr. path. Anat.* **115**, 529—560 (1955).
- HORVATH, W. M., and J. L. HOLLANDER: Intraarticular temperature as measure of joint reaction. *J. clin. Invest.* **28**, 469—473 (1949).
- HUETER, C.: Zur Histologie der Gelenkflächen und Gelenkkapseln. *Virchows Arch. path. Anat.* **36**, 25—80 (1866).
- *Klinik der Gelenkkrankheiten.* Leipzig: F. W. C. Vogel 1870.
- HUNTER, J., H. KERR and M. G. WILLIAMS: Relationship between joint stiffness and synovial fluid characteristics. *Fed. Proc.* **11**, 76—85 (1956).
- , and M. G. WILLIAMS: Study of effect of cold on joint temperature and mobility. *Canad. J. med. Sci.* **29**, 255—262 (1951).

- HUNTER, W.: Phil. Trans. B **42**, 514 (1743). Zit. nach SIGURDSON 1930.
- HUZELLA, TH.: Histologische Grundlagen der autonomen Funktion der Kapillaren. Erh. Anat. Ges. 1937, S. 61—68.
- ILLIG, L.: Experimentelle Untersuchung über die Entstehung der Stase. Virchows Arch. path. Anat. **326**, 501—562 (1955).
- Capillar „Contraktilität“, Capillar „Sphincter“ und „Zentralkanäle“ (A.-V.-Bridges). Klin. Wschr. **1957**, 7—22.
- ISHIDO, B.: Gelenkuntersuchungen. Virchows Arch. path. Anat. **144**, 424—428 (1923).
- JACOX, R. F., and A. FELDMANN: Abnormal humen joint fluids. J. clin. Invest. **34**, 362—367 (1955).
- JOSEPH, G. H., and G. H. PALMER: Capillary permeability: perfusion of frog and guineapig hind limbs. Amer. J. Physiol. **146**, 126—132 (1946).
- JOSEPH, N. R., C. I. REED and E. HOMBURGER: In vivo study of pH of synovial fluid in dogs. Amer. J. Physiol. **146**, 1—11 (1946).
- JUHLIN, L.: Studies on dermal connective tissue barrier and its reconstitution after administration of testicular and bacterial hyaluronidase. Effect of cortisone, protamine, heparin promethazin and compound 48/80. Arch. Pharmakol. (Köbenh.) **12**, 321—337 (1956).
- JUNGBLUTH, F., u. G. KUSCHINSKY: Eine Methode zur Beurteilung des Nierengefäßtonus bei Mäusen. Das Verhalten der Nierengefäße der Maus in den verschiedenen Stadien der Äthernarkose. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **225**, 533—540 (1955).
- KAPLAN, E. B.: Resection of obturator nerve for relief of pain in arthritis of hipjoint. J. Bone Jt Surg. **30**, 213—216 (1948).
- KELLOGG, J. H.: On distribution of pain arising from deep somatic structures with charts of segmental pain areas. Clin. Sci. **4**, 35—46 (1939).
- , and E. P. SAMUEL: Sensitivity and innervation of articular capsule. J. Bone Jt Surg. **32**, 84—92 (1950).
- KEY, J. A.: The synovial membranes of joints and bursae. In Spec. Cytology, Bd. II, p. 735. New York: P. H. Hoeber Inc. 1928.
- KLINGE, F.: Handbuch der speziellen Pathologie und pathologischen Anatomie, Bd. 9, II, S. 107. Berlin: Springer 1934.
- KLINGE, J.: Der Rheumatismus. Ergebn. allg. Path. path. Anat. **27**, 1 (1933).
- KÖLLIKER, A.: Mitt. Naturw. Ges. Zürich 1849. Zit. nach SIGURDSON.
- KROH, F.: Studien über den Bau der Synovialmembran und der Resorption des Gelenkinhaltes unter dem Einfluß variabler mechanischer Bedingungen. Dtsch. Z. Chir. **91**, 215—248 (1908).
- KRÜSKEMPER, H. L.: Über den Einfluß von Cortison und Schilddrüsenhormonen auf die Serumproteine. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 284—295 (1958).
- KUHNS, J. G.: Lymphatic drainage of joints. Arch. Surg. (Chicago) **27**, 345—391 (1933).
- KUIPERS, R. K. W., C. FRANKE and W. N. ROBERT: Effect of antirheumatic drugs on the resorption of J¹³¹ labelled albumin from the synovial fluid. Acta rheum. scand. **2**, 81—87 (1956).
- LANG, J.: Vitalfärbung der Gelenkinnenhaut. Verh. anat. Ges. **13**, 323—328 (1953).
- Bau und Funktion der Gefäße des Stratum synoviale. Anat. Anz. **103**, 13—19 (1956).
- Die Gelenkinnenhaut, ihre Aufbau- und Abbauvorgänge. Morph. Jb. **98**, 387—482 (1957).
- LANGER, E., u. F. HUTH: Untersuchungen über den submikroskopischen Bau der Synovialmembran. Z. Zellforsch. **51**, 545—559 (1960).
- LETTERER, E.: Über epitheliale und mesodermale Schleimbildung. Leipzig: S. Hirzel 1932.
- LUBOSCH, W.: Bau und Entstehung der Wirbeltiergelecke. Jena: Gustav Fischer 1910.
- Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere, Bd. V. Berlin u. Wien: O. Hertwig 1938.
- LUDWIG, C., u. F. W. SCHEIGGER-SEIDEL: Die Lymphgefäße der Fascien und Sehnen. Leipzig 1872. Zit. nach SIGURDSON.
- LURIE, M. B., and P. ZAPPADISI: Relative spread of particulate and diffusible substances in skin of male and female rabbits. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **42**, 741—744 (1939).
- MABNUS, G.: Über die Resorptionswege aus serösen und synovialen Höhlen. Dtsch. Z. Chir. **182**, 325—340 (1923).

- MACCONAILL, M. A.: Movements of bones and joints. Synovial fluids and its assistants. *J. Bone Jt Surg.* **32**, 244—252 (1950).
- MADINAVEITIA, J.: Diffusing factors; concentration of mucinase from testicular extracts and from *crotalus atrox* venom. *Biochem. J.* **35**, 447—452 (1941).
- and T. H. H. QUIBBEL: Studies on diffusing factors reduction of viscosity of vitreous humour preparations by ascorbic acid and some diazo compounds. *Biochem. J.* **35**, 453—455, 456—460 (1941).
- MAIBACH, E.: Histochemische Untersuchungen an der Synovialmembran als Beitrag zum Problem der Herkunft der Synovia. *Acta anat. (Basel)* **17**, 175—200 (1953).
- MARQUORDT, W.: Zur Histologie der Synovialmembran. *Z. Zellforsch.* **12**, 34—52 (1931).
- MARSHALL, E. K., and J. L. VICKERS: Mechanism of elimination of Phenolsulphonphthalein by kidney proof of secretion by convoluted tubules. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **34**, 1—7 (1923).
- MAUNSELL, K., F. WRIGLEY, T. C. HIGHTON and B. BOLL: Synovial membrane some observations in normal and arthritic human joints. *Ann. rheum. Dis.* **9**, 363—371 (1950).
- MAYEDA, T.: Experimentell histologische Studien über die Synovialmembran. *Mitt. med. Fak. Tokyo* **23**, 393—425 (1919/20).
- MC EWEN, C.: Cytologic studies on rheumatic fever. Cells of rheumatic exudates. *J. clin. Invest.* **14**, 190—201 (1935).
- MCMASTER, PH. E.: Intermittend take up of fluid from cutaneous tissue. *J. exp. Med.* **73**, 67—84 (1941).
- Factors influencing intermittend passage of Lockes solution into living skin. *J. exp. Med.* **73**, 85—108 (1941).
- MCMASTER, P. T.: Pressure and interstitial resistance prevailing in normal and edematous skin of animals and man. *J. exp. Med.* **84**, 437—494 (1946).
- Effects of venous obstruction upon interstitial pressure in animal and human skin. *J. exp. Med.* **84**, 495—509 (1946).
- , and R. J. PARSONS: Effect of pulse on spread of substances through tissue. *J. exp. Med.* **68**, 377—400 (1938).
- — Physiological conditions existing in connective tissue method of interstitial spread of vital dyes. *J. exp. Med.* **69**, 247—264 (1939).
- MENKIN, V.: The Symposium on the Mechanism of Inflammation. New York 1953.
- MEYER, K.: Biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* **27**, 335—359 (1947).
- , and E. CHAFFEE: Hyaluronic acid in pleura fluid associated with malignant tumor involving pleura and peritoneum. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **42**, 797—800 (1939).
- , and J. W. PALMER: Polysaccharide of vitreous humor. *J. biol. Chem.* **107**, 629—643 (1934).
- , and M. M. RAPPORT: Mucopolysaccharides of ground substance of connective tissue. *Science* **113**, 596—599 (1951).
- E. M. SMYTH and M. H. DAWSON: Isolation of mucopolysaccharide from synovial fluid. *J. biol. Chem.* **128**, 319—327 (1939).
- — Nature of mucopolysaccharide of synovial fluid. *Science* **88**, 129—134 (1938).
- MIKKELSEN, W. M., J. F. DUFF, C. W. CASTOR, A. J. FRENCH and H. A. ZEVELY: Synovial specimens obtained by knee joint biopsy. *Acta med. scand.* **162**, Suppl. **341**, 15—29 (1958).
- MILLEN, J. W.: Observations on Innervation of blood vessels. *J. Anat. (Lond.)* **82**, 68—80 (1948).
- MOFFET, B. C.: Studies on synovial permeability. Direct measurements of synovial permeability in rats. *Anat. Rec.* **118**, 813—823, 825—839 (1954).
- The distribution of blood vessels and nerves in the temporo mandibular joint of rhesus monkey. *Anat. Rec.* **118**, 431—456 (1954).
- MÜLLER, W.: Über negativen Luftdruck im Gelenkraum. *Dtsch. Z. Chir.* **218**, 395—397 (1929).
- Die Biologie der Gelenke. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1929.
- , u. H. LAUBER: Experimente über die Gelenkresorption unter verschiedenen physikalischen Bedingungen. *Bruns' Beitr. klin. Chir.* **155**, 39—50 (1932).

- MURRAY, P. D. F.: Grafts of longitudinal halves of limb-buds of 4 day. chick. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **5**, 181—186 (1928).
- MYERS, K.: Cement substances of connective tissue. *Ann. rheum. Dis.* **7**, 33—41 (1948).
- E. K. SMITH and M. H. DAWSON: Isolation of mucopolysaccharides from synovial fluid. *J. biol. Chem.* **128**, 319—323 (1939).
- NOETZEL, W.: Experimentelle Untersuchungen über die Infektion und die Bakterienresorption, 1. der Gelenke, 2. des Subduralraumes, sowie über den Unterschied in der Resistenz der verschiedenen Gewebe und Körperhöhlen. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **81**, 593—634 (1906).
- OPSAHL, J.: The influence of hormones from the adrenal cortex on the dermal spread of india ink with and without hyaluronidase. *Yale J. Biol. Med.* **21**, 255—268 (1949).
- PARSONS, R. J., and P. D. McMASTER: Effect of pulse upon formation and flow of lymph. *J. exp. Med.* **68**, 353—357 (1938).
- PARTRIDGES, S. M.: Chemistry of connective tissues, state of combination of chondroitin sulphate in cartilage. *Biochem. J.* **43**, 387—397 (1948).
- PAUL, W. D., R. W. HODGES, R. W. KNOUSE and C. S. WROUGHT: Effect of antirheumatic drugs on synovial permeability. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **21**, 255—268 (1949).
- RAGAN, CH., and K. MEYER: Hyaluronic acid, hyaluronidase and the rheumatic diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **92** (1950).
- RASZEJA, F., et J. BILLEWICZ-STANKIEWICZ: *Arch. int. Physiol.* **38**, 223 (1934). *Zit. nach GARDNER.*
- REDD, C. I., H. JOFFE and N. R. JOSEPH: Autonomic control of synovial fluid reaction. *J. Bone Jt Surg.* **29**, 370—376 (1947).
- REED, C. L.: Bioelectrical patterns in the synovialis in the dog. *Fed. Proc.* **11**, 128—130 (1952).
- RHINELANDER, F. W., G. A. BENNET and W. BAUER: Exchange of substances in aqueous solutions between joints and vascular system. *J. clin. Invest.* **18**, 1—19 (1939).
- RICKER, G.: Pathologie als Naturwissenschaft. Berlin 1924.
- RIEBOLD, G.: Über endokrine Arthropathien. *Münch. med. Wschr.* **1930**, 90—93.
- RINONAPOLI, E., e C. SANGUINETTI: Contributo istiochimico allo studio della sinoviale normale e patologica. *Arch. Putti Chir. Organi Mov.* **10**, 118—132 (1958).
- ROBECCHI, A., and F. PINO-SACCA: Vasocirculatory factor in genesis of arthritis deformans. *Minerva med. (Torino)* **2**, 725—729 (1949).
- ROPES, M. W., and W. BAUER: Published for the Commonw. Found. by Havard Univ. Press, Cambridge 1953.
- W. ROBERTSON, B. ROSMEISL, E. PEABODY and W. BAUER: Synovial fluid mucin. *Acta med. scand.* **128**, Suppl. **196**, 700—744 (1947).
- E. C. ROSMEISL and W. BAUER: Origin and nature of normal human synovial fluid. *J. clin. Invest.* **19**, 795—799 (1940).
- ROSTOCK, P.: Die Resorptionsfähigkeit des menschlichen Kniegelenkes bei verschiedenen Krankheitszuständen. *Dtsch. Z. Chir.* **215**, 76—84 (1929).
- RUCKES, J.: Die Wirkung der Hodenhyaluronidase auf die Resorptionsfähigkeit des Stratum synoviale des Kaninchens in Abhängigkeit von pH-Wert und Gelenkbeugung. *Bruns' Beitr. klin. Chir.* **200**, 50—55 (1960).
- , u. G. REISSLAND: Untersuchungen über den Gewebsstoffwechsel des Stratum synoviale und Gelenkknorpels des Kniegelenkes des Kaninchens. *Z. Rheumaforsch.* **19**, 135—138 (1960).
- RÜDINGER, N.: Die Gelenknerven des menschlichen Körpers. Erlangen: Ferdinand Enke 1857.
- SCAPINELLI, R.: Dati architetturali sui vasi sanguinici dei tessuti fibrosi nelle articolazione dell'uomo. *Arch. Putti Chir. Organi Mov.* **10**, 194—210 (1958).
- SCHEGA, H. W.: Eine Methodik zur fortlaufenden Registrierung postinfusioneller Ödembildung am Magen-Darmkanal des lebenden Versuchstieres. *Z. ges. exp. Med.* **122**, 287—298 (1953).
- Die Ödembildung in den Wandungen des Magen-Darmkanals nach intravenösen Infusionen. *Bruns' Beitr. klin. Chir.* **188**, 109—126 (1954).
- Der Austausch extrazellulärer Flüssigkeit an der Kapillarwand und seine Triebkräfte. *Dtsch. med. Wschr.* **1957**, 170—473.

- SCHMIDT, M. B.: Handbuch der pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. 9, S. 1. Berlin: Springer 1929.
- SCHÜRCH, O., G. VIOLLER u. H. SÜLLMANN: Elektrophoretische Untersuchung von Kniegelenksergüssen. Schweiz. med. Wschr. **80**, 711—715 (1950).
- SCHWEIGGER-SEIDEL, F.: Arb. physiol. Anst. Leipzig, 150 (1866). Zit. nach SIGURDSON.
- SEEMEN, S. K.: Versuche mit Vitalfärbung an Gelenken. Zbl. Chir. **55**, 113—118 (1928).
- SEGALÉ, C.: Untersuchungen über die Regeneration der Kniegelenkscapsel nach Total-exstirpation. Bruns' Beitr. klin. Chir. **87**, 259—273 (1913).
- SEIFTER, J., and D. J. BAEDER: Partially depolymerized hyaluronic acid (PDHA) as spreading agent. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **85**, 160—162 (1954).
- — — Technical factors influencing permeability of synovial membrane in rabbit. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **87**, 276—280 (1954).
- — — and W. D. BECKFIEDD: Effect of streptococcal hyaluronic acid (SHA) in mice, rats, rabbits and dogs. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **85**, 444—446 (1954).
- — — and A. J. BEGANY: Influence of hyaluronidase and steroids on permeability of synovial membrane. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **72**, 177—282 (1949).
- — — and A. BLUMENTHAL: Technical factors influencing the permeability of synovial membrane. Fed. Proc. **11**, 389—396 (1952).
- P. C. WARTER and D. R. FITCH: Preliminary observations on antiarthritic effect of 21-acetoxypregnenolone. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **73**, 131—134 (1950).
- SHERMAN, M. S.: Nonspezifität of synovial reactions. Bull. Johns Hopk. Hosp. Jt Dis. **12**, 110—125 (1951).
- SIBER, O.: Über den feineren Bau der Gelenkkapsel. Verh. phys.-med. Ges. Würzb. **54**, 22—24 (1930).
- Über die Entstehung und Bedeutung der Gelenkzotten. Langenbecks Arch. klin. Chir. **170**, 458—469 (1932).
- SIGURDSON, L. A.: The structure and funktion of articular synovial membranes. J. Bone Jt Surg. **12**, 603—639 (1930).
- SIXT, : Über die Kreislaufwirkung von Myocain am Menschen und im Tierexperiment. Inaug.-Diss. München 1955.
- SONNENSCHN, A.: Biologie, Pathologie und Therapie der Gelenke, dargestellt am Kniegelenk. Basel u. Stuttgart: Benno Schwabe & Co. 1952.
- SOUBOTTINE, M.: Grundlagen der Theorie der Medizin. Berlin: Saenger 1950.
- SPIRA, E.: Ein experimenteller Beitrag zur Frage des Resorptionsvorganges im Kniegelenk des Kaninchens. Bruns' Beitr. klin. Chir. **165**, 647—651 (1937).
- STÄEMMLER, M.: Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung der histiogenen Mastzellen im menschlichen Körper unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Frankfurt. Z. Pat. **25**, 391—453 (1921).
- STARLING, E. H.: J. Physiol. (Lond.) **19**, 213 (1895/96). Zit. nach SCHEGA.
- STECK, J. E., F. FOLK and E. KAPLAN: Electrochemical study of synovialis in dogs. Amer. J. Physiol. **153**, 364—380 (1948).
- N. R. JOSEPH and C. J. REED: The pH of synovial fluid in anaesthetized dog under treatment with metrazol and insulin. J. Bone Jt Surg. **30**, 500—518 (1948).
- STÖHR jr., PH.: Mikroskopische Anatomie des vegetativen Nervensystems. Berlin: Springer 1928.
- STUDER, A.: Zur Frage der Angriffsorte von Compound E (Cortison). Z. ges. exp. Med. **121**, 287—418 (1953).
- SUNDER-PLASMANN, P., u. K. DAUBENSPECK: Die vegetative Innervation der Synovialmembran des menschlichen Kniegelenkes. Dtsch. Z. Chir. **250**, 158—172 (1938).
- TANNENBERG, J.: Bau und Funktion der Blutkapillaren. Frankfurt. Z. Path. **34**, 1—19 (1926).
- TILLMANN, H.: Die Lymphgefäße der Gelenke. Arch. mikr. Anat. **12**, 649—664 (1876).
- VAUBEL, E.: The form and function of synovial cells in tissue cultures. I. u. II. J. exp. Med. **58**, 63—85 (1933).
- Über das Synovialgewebe. Virchows Arch. path. Anat. **289**, 670—687 (1933).
- Biologische Grundlagen der Gelenkerkrankungen. Dtsch. med. Wschr. **1948**, 366—372.
- WARREN, C. F., G. A. BENNET and W. BAUER: Significance of cellular variation occurring in normal synovial fluid. Amer. J. Path. **11**, 953—968 (1935).

- WATANABE, M.: Über die epitheloiden Histiocyten der Synovialmembran. Trans. jap. path. Soc. **22**, 493—512 (1932).
- WHITE, J. C., E. M. FIELD and C. K. DRINKER: On protein content and normal flow of lymph from foot of dog. Amer. J. Physiol. **103**, 34—44 (1933).
- WILLIAMS, R. G.: Effects of vintinous local injection of hyaluronidase on skin and subcutaneous tissue in rats. Anat. Rec. **122**, 349—361 (1955).
- WOLCOTT, W. E.: Regeneration of synovial membrane following typical synovectomy. J. Bone Jt Surg. **9**, 67—75 (1927).
- ZWEIFACH, B. W.: Micro-manipulative study of blood capillaries. Anat. Rec. **59**, 83—108 (1934).
- Structure and reactions of small blood vessels in amphibia. Amer. J. Anat. **60**, 473—541 (1937).
- Character and distribution of blood capillaries. Anat. Rec. **73**, 475—495 (1939).
- Direct observations of mesenteric circulation in experimental animals. Anat. Rec. **120**, 277—291 (1954).
- , and R. R. CHAMBERS: The action of hyaluronic extract on the capillary wall. Ann. N.Y. Acad. Sci. **52**, 1047—1051 (1950).
- , and C. E. KOSSMANN: Micromanipulation of small blood vessels in mouse. Amer. J. Physiol. **120**, 23—35 (1937).
- B. E. LOWENSTEIN and R. CHAMBERS: Responses of blood capillaries to acute hemorrhage in rat. Amer. J. Physiol. **142**, 80—93 (1944).

Privatdozent Dr. J. RUCKES,
Pathologisch-Anatomisches Institut, Mainz, Langenbeckstr. 1

Zoologisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht (Holland)

HISTOCHEMICAL ANALYSIS AND CYTOLOGICAL INVESTIGATIONS ON THE CORONET CELLS OF THE SACCUS VASCULOSUS OF THE RAINBOW TROUT (*SALMO IRIDEUS*)

By

W. F. JANSEN and J. C. VAN DE KAMER

With 8 Figures in the Text

(Received June 2, 1961)

Introduction

In recent years several arguments have been put forward in favour of a secretory function of the coronet cells of the saccus vasculosus in fish. BARGMANN (1954) arrived at this conclusion from the results of special staining reactions and together with KNOOP from electron microscopical work (BARGMANN and KNOOP 1956), VAN DE KAMER and VERHAGEN (1954) from cytological studies and VAN DE KAMER, JANNY BODDINGIUS and BOENDER (1960) from injection experiments with pilocarpine.

In the last mentioned paper the hypothesis was raised of the formed product being an acid mucopolysaccharide. To verify this suggestion a histochemical analysis was started not only of the substance present within the saccus cavity but also of the substance situated in the coronet cells, particularly inside the hairs and the globules. In the meantime STAHL and SEITE (1960) and ZWILLENBERG (1961) were able to demonstrate the presence of an acid mucopolysaccharide in the saccus vasculosus of several species of bony fishes.

It is the object of this article to put forth new arguments to confirm these results and to extend the cytological observations on the coronet cells.

Material and Methods

The animals were adult trouts (*Salmo irideus*) about 24 cm in length, bred by the "Nederlandse Heide Mij.". Some animals were injected with 1 ml of a solution of pilocarpine dissolved in a physiological salt solution (cf. VAN DE KAMER, J. BODDINGIUS and BOENDER 1960), the greater part of the animals were untreated individuals. All animals were anaesthetized in a 0.035% MS 222 solution. The saccus vasculosus was exposed from the ventral side and pre-fixed for 2 hrs in the fixation fluid. Next the pre-fixed brain including the saccus tissue was removed and post-fixed. Dependent on the staining reactions, the following fixation mixtures were used: Helly's fluid for 11—24 hrs, formol-calcium 10% for 24 hrs, Bouin-Allen's fluid for 2 hrs followed by fixation for 22 hrs in Bouin's fluid, and Rossman's fluid for 7½ hrs at a temperature of —7° C.

After imbedding the tissue in paraffin and cutting sections of 6 μ the following staining methods were applied: the P.A.S. method, the P.A.S. method after previous acetylation according to McMANUS and CASON (1950), the P.A.S. method after saliva digestion, the aldehyde fuchsin (A.F.) method of GOMORI with the GABE modification (1953) also without a previous oxydation in permanganate sulphuric acid, the Alcian blue technique according to ADAMS and SLOPER (1956) also without a previous oxydation in performic acid, the Azur A method of KRAMER and WINDRUM (1955) and the toluidine blue method according to HESS and HOLLANDER (1947). For the detection of lipids, use was made of the normal Sudan black technique and the Sudan black method after lipid extraction by a mixture of equal parts of

chloroform and methanol at 60° for 24 hrs (cf. SCHIEBLER 1952). For protein detection the following methods were applied: the ninhydrin-SCHIFF method for protein-bound NH_2 of YASUMA and ICHIKAWA (1953) and another variant of LIPP (1959) as used by SCHIEBLER (personal communication), the MILLON reaction in the BENSLEY and GERSH modification (1933), and in the LEUCHTENBERGER variant (1950), the bromphenol blue method of DURRUM in the modification of MAZIA, BREWER and ALFERT (1953), the coupled tetrazonium reaction and the same method after benzylation (PEARSE 1960). The bromphenol blue method was also used after incubation of the slides in trypsin at 37° for 2 hrs (cf. ROMEIS 1948).

Results

After staining of the slides with P.A.S., the secretion inside the saccus cavity reacted strongly. Moreover, several coronet cells reacted also. It was possible to distinguish cells with P.A.S. positive cytoplasm, with P.A.S. positive granules orientated in the form of a crescent in the apical protrusions of the cell, and cells with P.A.S. positive basal corpuscles, "hairs" and globules (Fig. 1 and 2).

It is well known that in the P.A.S. reaction the aldehyde groups of the substrate react with the fuchsin sulphurous acid of SCHIFF's reagent to form a red dye. However, the reaction cannot be considered as a specific one, as not only saccharides react strongly after oxydation with periodic acid, but also some proteins (containing special amino acids) and some lipids can be oxydized and stained by this method. In order to determine whether the positive P.A.S. reaction

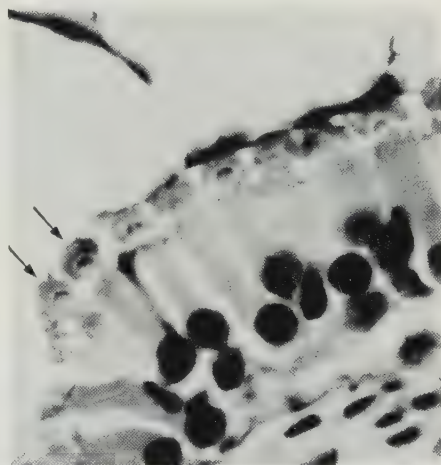


Fig. 1. Coronet cells showing P.A.S. positive material inside their apical protrusions (arrows) and on top of the globules of the crown. 1050 \times

in the saccus vasculosus was caused by proteins, lipids, saccharides or compound mixtures of these substances, special staining techniques were used.

For the identification of proteins two varieties of the ninhydrin-SCHIFF reaction, a modified MILLON reaction, the bromphenol blue method and a tetrazonium reaction were applied. The results of the first three reactions were identical; the material inside the saccus cavity was negative with these stains, whereas control sections of tissue of the pancreas of the same animal, mounted on the same slide, stained positive. After having applied the tetrazonium- and the bromphenol blue method, the protoplasm of some coronet cells as well as some globules, "hairs" and basal corpuscles stained weakly positive, indicating the presence of proteins. When the tetrazonium method was applied after a treatment with benzoylchloride in dry pyridine for 20 hours at room temperature, the reaction was totally negative. As it is known that after benzylation amino groups are blocked, this negative result points also to the presence of proteins within the crown of the coronet cells.

Digestion with trypsin did not change the staining reaction of the substance in the saccus cavity. It may therefore be concluded that the P.A.S. positive

substance present in the saccus cavity does not contain proteins in demonstrable quantity.

The absence of proteins in the secretion inside the cavity and their presence within the crown of the coronet cell indicates the probability of the proteins belonging to the structural frame of the cell body and not to the secretion product.

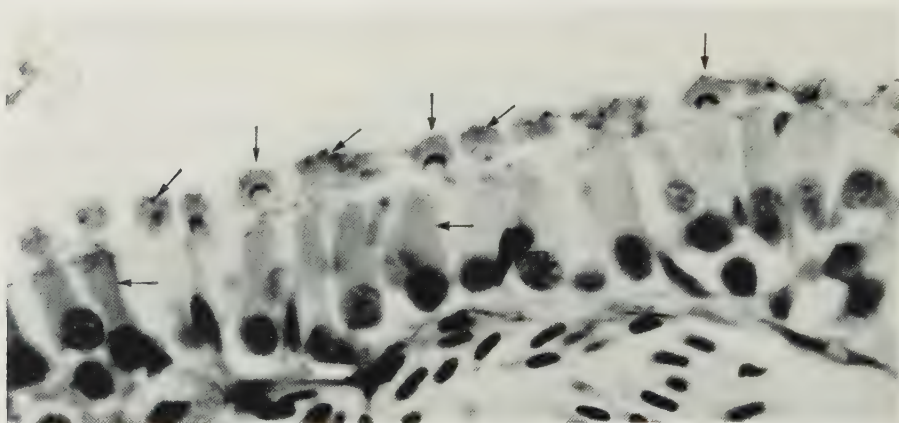


Fig. 2. Coronet cells stained with the P.A.S. method. In some cells stainable granules within their apical protrusions are visible (vertical arrows); in others a positive reaction in the cytoplasm of the cell body (horizontal arrows) and in the globules of the crown (inclined arrows) can be observed. 1050 \times

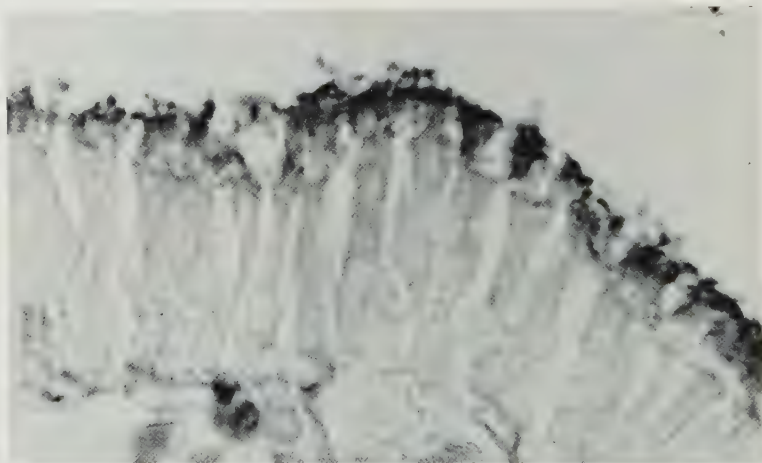


Fig. 3. Part of the saccus vasculosus tissue, stained with AF after previous oxydation. Note a strong reaction in the globules of the crown of the coronet cells. 1050 \times

Concerning the lipids, the Sudan black reaction was carried out with negative result. After lipid extraction with chloroform and methanol, the secretion inside the cavity was not removed. From these facts it may be concluded that the substance in the saccus cavity does not contain any lipids in demonstrable quantity.

After the elimination of proteins and lipids, which might be responsible for the positive P.A.S. reaction of the formed product, an investigation was made into the nature of the groups, which after transformation into aldehydes, are

responsible for the staining reaction. For that reason, the acetylation method of McMANUS and CASON was used.

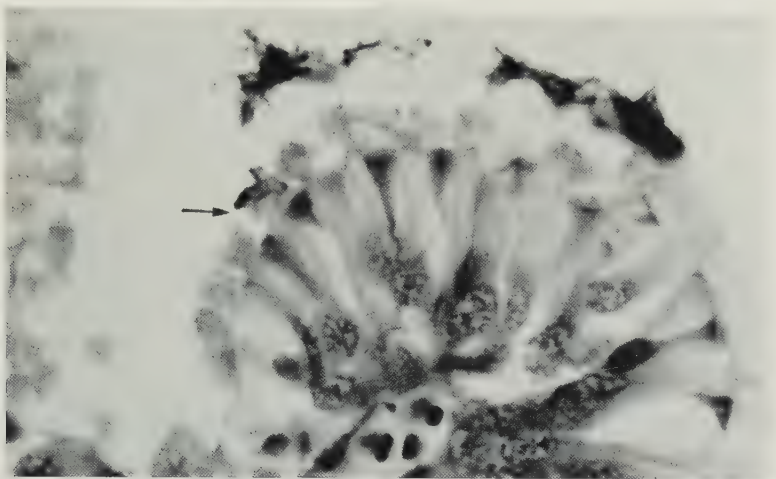


Fig. 4. Coronet cells stained with azur A. Note the metachromatic reaction of the secretion inside the cavity and in one of the cells (arrow). In this cell the basal corpuscles, "hairs" and globules of the crown reacted all metachromatically. 1050 \times

On acetylation the 1:2-glycol groups and the 1:2-hydroxyamino groups are blocked, in consequence of which they cannot be oxydized and transformed into aldehydes. If, thereupon, de-acetylation by treatment with alkali is applied, oxydation of the groups into aldehydes is again achieved. After having applied this acetylation technique, the coronet cells and the secretion within the saccus cavity were both totally negative, whereas after de-acetylation the staining reaction returned immediately.

As amino groups could not be demonstrated in the secretion it may be inferred that by oxydation with periodic acid, glycol groups are transformed into aldehydes. The substance formed in the coronet cells and secreted into the cavity may be considered to be a saccharide.

According to GABE (1955), aldehyde as well as sulphonic acid groups react with aldehyde fuchsin (A.F.) after oxydation of the sections with permanganate-sulphuric acid (GOMORI's method). Without the previous oxydation only the aldehyde and acid groups already present in the substrate will react with A.F.

Consequently, if the saccharide of the saccus vasculosus contains acidic groups, a reaction with A.F. without a previous oxydation will give a positive

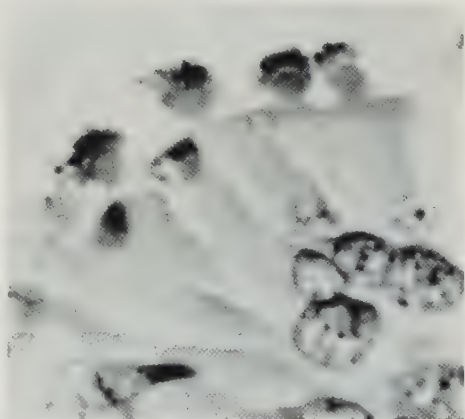


Fig. 5. Some coronet cells stained with toluidine blue. Note the strong metachromatic reaction in the basal corpuscles, the "hairs" and the globules of the crown. 1700 \times

result. Applying this technique to the saccus slides, the globules, "hairs" and basal corpuscles of the coronet cells, and the secretion within the saccus cavity stained clearly. The presence of acidic groups in the formed saccharide is thus established. As a matter of fact, the A.F. reaction, after previous oxydation of the sections with permanganate sulphuric acid, reveals a still stronger staining effect. If by the previous oxydation the structure of the cellular crown is not too badly damaged, the reaction is particularly distinct in the globules of the crown (cf. Fig. 3). This stronger stainability can be ascribed to the presence of aldehyde groups formed by oxydation.

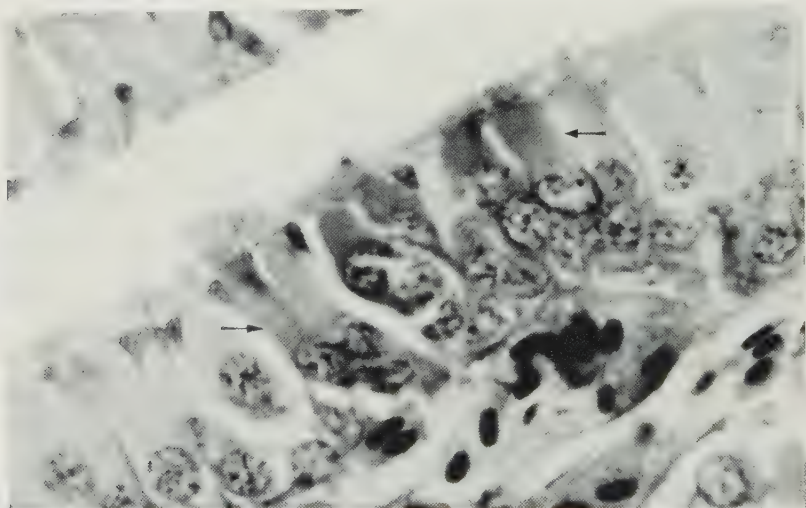


Fig. 6. Part of the saccus vasculosus tissue, showing metachromatic staining cytoplasm of some coronet cells (arrows). Toluidine blue. 1050 \times

The foregoing findings made it highly probable that the secretion product is an acid mucopolysaccharide. For testing purposes, use was made of the metachromatic stains Azur A and toluidine blue. In both tests, the globules, "hairs" and basal corpuscles, as well as the content of the saccus cavity stained metachromatically (Fig. 4, 5). The material can therefore be identified with an acid mucopolysaccharide. In some cases the metachromatic staining reaction of the cytoplasm of some coronet cells could be observed. These reacting cells alternated with others which did not show any sign of metachromasia (Fig. 6, 7). In one case, the staining of the basal corpuscles was extremely intense. In this connection, small metachromatically stainable granules could be observed within the cytoplasm of the coronet cells (Fig. 8).

To determine the nature of the acidic groups in the mucopolysaccharide, the Alcian blue technique was applied. This stain can be used at an extremely low pH (0.2) and supplies information on the nature of the acidic groups. At this low pH , the dissociation of the weakly acidic groups is depressed, whereas only the dissociation of the strongest acidic groups remains. This technique applied to the coronet cells of the saccus reveals a strong staining effect of the globules of the crown and of the secretion in the cavity and a small reaction in the cytoplasm of some coronet cells. These results indicate the presence of sulphonic groups in the

acid mucopolysaccharide. If the Alcian blue stain is used after previous oxydation of the slides with performic acid, the staining reactions of the globules and of the secretion do not change much. However, the protoplasm of some coronet cells

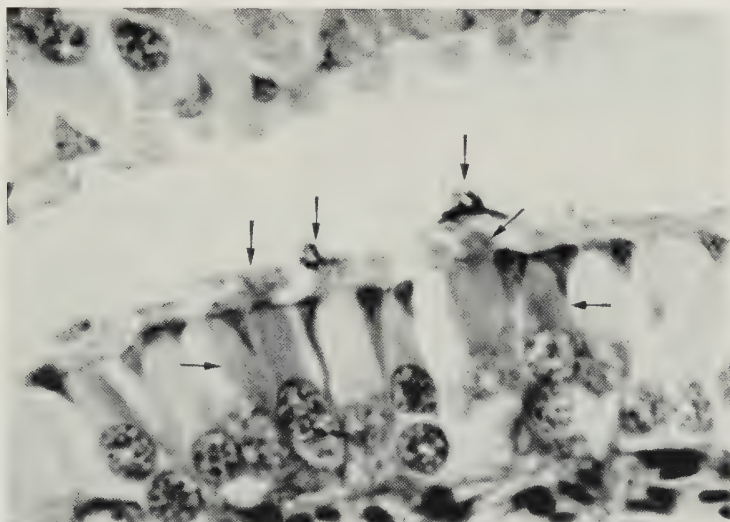


Fig. 7. Part of the saccus vasculosus tissue after toluidine blue staining. Note the metachromasia of the cytoplasm of some cells (horizontal arrows) as well as the reaction of an apical protrusion (inclined arrow), some globules and the secretion on top of the globules of the crown (vertical arrows). 1050 \times

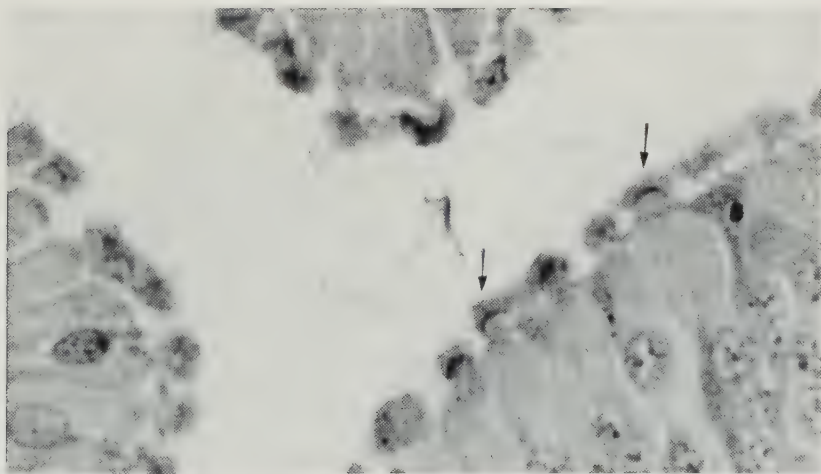


Fig. 8. Metachromatic reaction of the basal corpuscles of some coronet cells (vertical arrows). Granules within the cytoplasm of the cell body are also weakly stained. Toluidine blue. 1050 \times

now stains very strongly. As it is known that cystine is selectively oxydized by performic acid, these results suggest the presence of this amino acid within these cells. The presence of material rich in cystine inside some coronet cells corresponds perfectly with the weakly positive tetrazonium and bromphenol blue reactions for protein in the protoplasm of some coronet cells, described above.

Summarizing our results, it can be stated that acid mucopolysaccharides containing sulphonic acid groups are present not only in the cavity of the organ but also in the globules, "hairs" and basal corpuscles of the coronet cells. Moreover, in the crown of the coronet cells the presence of proteins (probably belonging to the structural frame of the cell body) could be determined, whereas the material inside the cavity did not contain proteins and lipids in demonstrable quantity. Furthermore, the presence of material rich in cystine within some of the coronet cells seems highly probable.

Discussion

During previous investigations (VAN DE KAMER, JANNY BODDINGIUS, BOENDER 1960), the material within the apical protrusions of the coronet cells had been determined as glycogen, and the hypothesis was advanced that this glycogen was used up in the formation of an acid mucopolysaccharide, which was first stored in the globules and ultimately secreted into the ventricle. In this study the presence of acid mucopolysaccharides is established. Moreover, it is suggested that cystine molecules appear within the coronet cells. Consequently, it seems highly probable that the cystine molecules will act as sulphur donors in a process in which the polysaccharide glycogen is transformed into a sulphur containing acid mucopolysaccharide. This view has also been expressed by ZWILLENBERG (1961), who was able to demonstrate with a performic acid-aniline-aldehyde-thionine reaction, that special coronet cells contain more disulphide groups than their non-staining neighbours.

It is still an open question where the acid mucopolysaccharide synthesis will take place inside the coronet cells. ZWILLENBERG succeeded in demonstrating a metachromatic staining reaction of the cytoplasm of the coronet cells. This statement can be confirmed (cf. Figs 6, 7). Besides, in our investigations all parts of the crown stained clearly metachromatically. The presence of the material within or around the basal corpuscles, and inside the "hairs" and the globules could be demonstrated (cf. Fig. 4, 5). In one case the presence of metachromatically stainable granules within the cytoplasm could be established (cf. Fig. 8). It seems probable that the synthesis of the acid mucopolysaccharide is initiated in the cell body and the formed product will be transported to the basal corpuscles. The material may then move through the hollow "hairs" (cf. BARGMANN 1955, 1956) into the globules, where it is stored before it is secreted into the cavity of the organ.

From the work of FAWCETT and PORTER (1954) it is known that basal corpuscles possess a dense osmiophilic shell enclosing a core of protoplasm of very low electron-optical density. In BARGMANN's studies the continuity of this central core on its apical side with the cavity of the hair and on its basal side with the cell protoplasm is clearly demonstrated. The material can be transported from the protoplasm through the basal corpuscles into the globules. However, the question remains how the acid mucopolysaccharide reaches the basal corpuscles and enters them.

The metachromatic staining reaction of the basal corpuscles is an unknown phenomenon and it will be worth while to study the basal corpuscles of other cilia with the same methods so as to determine whether it is a general rule.

All facts summarized above point to a secretory function of the coronet cells. Although at present resorption by these cells cannot be precluded, the presence of cystine and glycogen within the cells and of an acid mucopolysaccharide inside the organ cavity are, in our opinion, more in favour of secretion than of resorption.

Finally, it seems that animals analysed in spring showed the glycogen storage in the apical protrusions more clearly and abundantly than animals treated during winter time. It is possible that the process described above is dependent on the season.

Summary

1. Acid mucopolysaccharides, containing sulphonic acid groups are present in the cavity of the saccus vasculosus and also in the globules, "hairs", and basal corpuscles of the coronet cells.
2. Proteins, probably belonging to the structural frame of the cell body, can be determined.
3. The acid mucopolysaccharide inside the cavity of the organ does not contain proteins and lipids in demonstrable quantity.
4. The presence of cystine molecules within some coronet cells seems highly probable.
5. The localisation and the mode of synthesis of the acid mucopolysaccharide inside the coronet cells is discussed.

References

- ADAMS, C. W. M., and J. C. SLOPER: The hypothalamic elaboration of posterior pituitary principles in man, the rat and dog. Histochemical evidence derived from a performic acid-Alcian blue reaction for cystine. *J. Endocr.* **13**, 221—228 (1956).
- BARGMANN, W.: Über Feinbau und Funktion des Saccus vasculosus. *Z. Zellforsch.* **40**, 49—74 (1954).
- Der Saccus vasculosus. In: Progress in neurobiology. Proc. of the first Intern. meeting of Neurobiologists p. 109—112. Amsterdam: Elsevier 1956.
- , and A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Krönchenzellen des Saccus vasculosus. *Z. Zellforsch.* **43**, 184—194 (1955).
- BENSLEY, R. R., and I. GERSH: Studies on cell structure by the freezing-drying method. *Anat. Rec.* **57**, 217—237 (1933).
- FAWCETT, D. W., and K. R. PORTER: A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J. Morph.* **94**, 221—282 (1954).
- GABE, M.: Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde. *Bull. Micros. appl.* **3**, 153—162 (1953).
- Signification histochimique de certaines affinités tinctoriales du produit de neuro-sécrétion hypothalamique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **149**, 462—464 (1955).
- HESS, M., and F. HOLLANDER: Permanent metachromatic staining of mucus in tissue sections and smears. *J. Lab. clin. Med.* **32**, 905—909 (1947).
- KAMER, J. C. VAN DE, JANNY BODDINGIUS and J. BOENDER: On the structure and the function of the saccus vasculosus of the rainbow trout (*Salmo irideus*). *Z. Zellforsch.* **52**, 494—500 (1960).
- , and Th. G. VERHAGEN: The cytology of the neurohypophysis, the saccus vasculosus and the recessus posterior in *Scylliorhinus caniculus*. *Proc. kon. ned. Akad. Wet.* **57**, 358—364 (1954).
- KRAMER, H., and G. M. WINDRUM: The metachromatic staining reaction. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 227—237 (1955).
- LEUCHTENBERGER, C.: Cytochemical study of pycnotic nuclear degeneration. *Chromosoma (Berl.)* **3**, 449—473 (1950).
- LIPP, G. W.: *Histochemische Methoden*. München: Oldenburg 1959.

- MAZIA, D., P. A. BREWER and M. ALFERT: The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *Biol. Bull.* **104**, 57—67 (1953).
- MCMANUS, J. F. A., and J. E. CASON: Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. *J. exp. Med.* **91**, 651—654 (1950).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry theoretical and applied*. London: Churchill Ltd. 1960.
- ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. München: Leibniz 1948.
- SCHIEBLER, T. H.: Zur Histochemie des neurosekretorischen hypothalamisch-neurohypophysären Systems, Teil II. *Acta anat. (Basel)* **15**, 393—416 (1952).
- STAHL, A., and R. SEITE: Contribution à l'étude du sac vasculaire des Poissons Téléostéens. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **154**, 1020—1022 (1960).
- YASUMA, A., and T. ICHIKAWA: Ninhydrin-Schiff and Alloxan-Schiff staining. *J. Lab. clin. Med.* **41**, 296—299 (1953).
- ZWILLENBERG, L. O.: Histochemische Beobachtungen am Saccus vasculosus der Forelle. *Z. Zellforsch.* **54**, 437—442 (1961).

Dr. J. C. VAN DE KAMER
 Zoologisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht
 Janskerkhof 3, Nederland

Aus dem Zoologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen und dem Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie der Medizinischen Akademie Düsseldorf

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER PIGMENTGRANULA IN DEN SCHILLERNDEN FEDERSTRAHLEN DER TAUBE *COLUMBA TROCAZ* H.

Von

W. J. SCHMIDT und H. RUSKA

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Mai 1961)

Kürzlich hat der eine von uns (SCHMIDT 1961 b) gezeigt, daß die kugeligen, rostbraunen, optisch isotropen *Phaeomelanin-Granula* in den schillernden Federn der Taube *Columba trocaz* H.¹ Doppelbrechung zeigen, wenn sie durch Pressen oder durch die Wirkung des Mikrotommessers deformiert wurden. Er hat dies auf Orientierung vorher wirr liegender submikroskopischer Bausteine des Granulum bezogen.

Diese Auffassung elektronenmikroskopisch zu prüfen lag nahe. Zur Untersuchung kamen die als „Strahlen“ (Radii) bekannten Sekundärzweige der Feder, die den vom Schaft ausgehenden „Ästen“ (Rami) beiderseits ansitzen (Abb. 1 a). Die Dünnschnitte (etwa $0,1 \mu$ dick) wurden von einzelnen, in Vestopal eingebetteten Federästen senkrecht zur Achse hergestellt, so daß die Strahlen unter einem Winkel von etwa $60\text{--}65^\circ$ zu ihrer Längsachse getroffen sind (s. Abb. 1 a).

Befund

Jeder Radius besteht aus einer Reihe sehr stark abgeplatteter Zellen von annähernd rechteckigem Umriß; die Dicke des Objektes entspricht also jener der einzelnen Zelle. In Flächenansicht der Zelle sieht man bei stärkerer Vergrößerung den Kern als meist granulafreie Stelle (Abb. 1 b). Die Grenzen der melaningefüllten Zellen treten an den einzelnen Strahlen als helle pigmentfreie Streifen hervor (Abb. 1 a und b).

Jede Zelle (Abb. 2) zeigt auf dem Schnitt im elektronenmikroskopischen Bild außen den „Keratinmantel“ (K)², der einen luftgefüllten „*intramoenialen*“² Raum umschließt, in dem sich die *Granula* (G) befinden; wo diese gehäuft sind, erscheinen sie in 2—3 Schichten in dem flachen intramoenialen Raum übereinander, besonders dicht gereiht an dessen Rande. Außerdem finden sich hier und da „*intramoeniale Tonofibrillenstränge*“ (I) (s. S. 385).

¹ Kugelige Granula finden sich auch in den schillernden Federn anderer Angehöriger der Gattung *Columba* und bei weiteren Genera der Columbidae, z. B. bei *Columba livia*, der Stammform der zahlreichen Rassen der Haustaube. *Columba trocaz* wurde wegen der ungemeinen Größe der Granula zum Untersuchungsobjekt gewählt. Es sei noch bemerkt, daß bei diesen Federn das Schillern nicht, wie gewöhnlich, von Struktur und Lage der Melaningranulen unmittelbar hervorgerufen wird, sondern durch die dünne Luftschicht im „intramoenialen“ Raum zwischen den Granula und dem Keratinmantel.

² Über Terminologie s. W. J. SCHMIDT (1961 a).

Betrachten wir nun die einzelnen Teile der Radiuszelle näher. Der *Keratin-mantel* an der Zelloberfläche, der an den Seitenkanten der Strahlen gerundet von

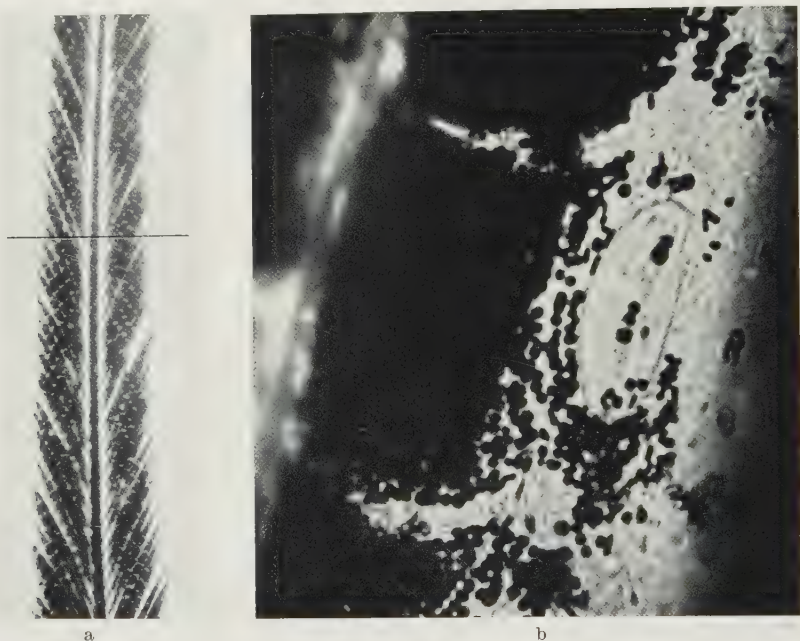


Abb. 1a u. b. *Columba trocaz*. a Stück eines schillernden Federastes (Ramus) mit den beiderseits ansitzenden Strahlen (Radii), 60:1. Der Strich gibt die Schnitttrichtung für die elektronenmikroskopische Untersuchung an. b Radiuszelle mit Granula und Kernrest. 1750:1. Auf dem Kern und auch nach oben davon Andeutung von Tonofibrillen

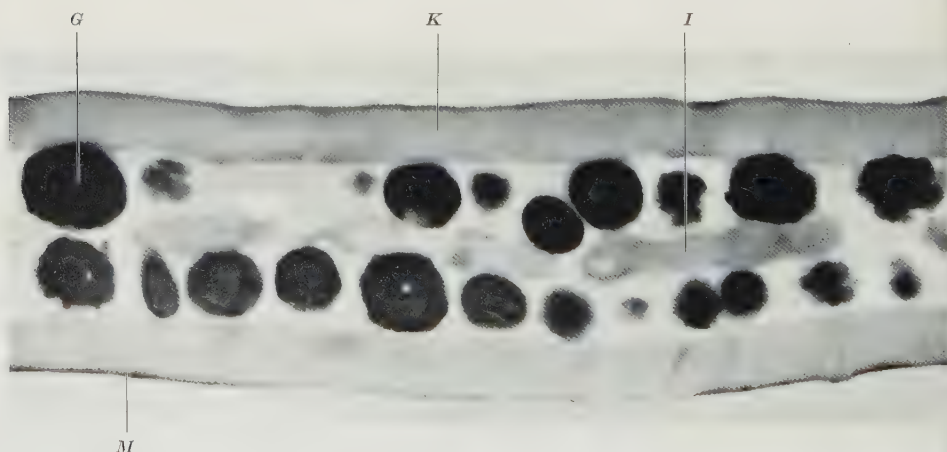


Abb. 2. *Columba trocaz*, Teil des Querschnittes einer Radiuszelle, 15000:1. *K* Keratinmantel; *M* seine Grenzmembran; *G* Granulum; *I* Intramoeniale Tonofibrillenbündel

der Außen- auf die Innenfläche übergeht, erscheint im elektronenmikroskopischen Bild von fast gleichbleibender Dicke (etwa $0,5\mu$), strukturlos, auf der glatten Außenseite von einer feinen *Grenzmembran* (*M*) abgeschlossen. Eine solche wurde bereits von PHILIP, LANGERMALEN und GRALÉN (1950, 1951) im Elektronen-

mikroskop beim Haushuhn sichergestellt; sie besteht nach den Autoren aus zwei Schichten, deren äußere am widerstandsfähigsten ist. Übrigens läßt sie sich auch durch Abheben nach Maceration mit konzentrierter Schwefelsäure oder Wasserstoffsuperoxyd im Lichtmikroskop sichtbar machen (W. J. SCHMIDT 1949, Schillerradien von Pavo), was auch MATTERN (1956) an Federn von *Xipholena lamellipennis* gelang.

Da der Keratinmantel der Strahlzellen von *Columba trocaz* wie bei anderen Federn positiv doppelbrechend zur Länge des Radius wirkt, muß man in ihm längsverlaufende Tonofibrillen annehmen; in der Tat lassen sich solche bei manchen anderen Formen nach Maceration im Lichtmikroskop wahrnehmen (W. J. SCHMIDT 1949); auch Abb. 1 b zeigt sie angedeutet über dem Kernbereich. Im elektronenmikroskopischen Bild dagegen fehlen bisher deutliche Hinweise auf diese Struktur des Keratinmantels.

Dort, wo in der Länge des Federstrahles die Zellen aneinanderstoßen, überlappen sie sich ein wenig, wie an ihrer Profilansicht im Lichtmikroskop erkennbar. In Abb. 3 scheint der Querschnitt einer solchen Stelle vorzuliegen. Man sieht übereinander zwei Zellen, deren Keratinmäntel an der Berührungsebene (B) dünner sind als auf den freien Flächen; zugleich erscheinen sie nicht wie sonst eben, sondern gewellt, derart, daß zwischen den beiden Zellen längliche Räume frei bleiben, deren große Achse parallel der Berührungsebene geht. Vielleicht liegt hier die für die Wirbeltierepidermis elektronenmikroskopisch mehrfach nachgewiesene „reißverschlußähnliche“ Verfüzung der Zellen vor. Sie läßt sich übrigens an den Strahlen mancher Vögel auch lichtmikroskopisch erkennen (noch nicht veröffentlicht, SCHMIDT).

Die *Melaninkörnchen* zeigen im Lichtmikroskop (Abb. 1 b), an ganzen Strahlen — also in völlig unberührtem Zustande — untersucht, meist kreisförmigen glatten Umriß; nur die größten bieten manchmal Andeutungen kantiger Umgrenzung dar. Der Durchmesser der Granula schwankt in einer Zelle beträchtlich (etwa $1-3\ \mu$) und nimmt nach der Basis des Federstrahles hin allmählich ab. Irgendwelche Strukturen lassen sich lichtmikroskopisch an den Pigmentgranula nicht erkennen.

Das Elektronenmikroskop aber bringt an den Melaningranula bemerkenswerte Einzelheiten zutage: Ihr *Umriß* ist nur selten völlig glatt und kreisförmig,

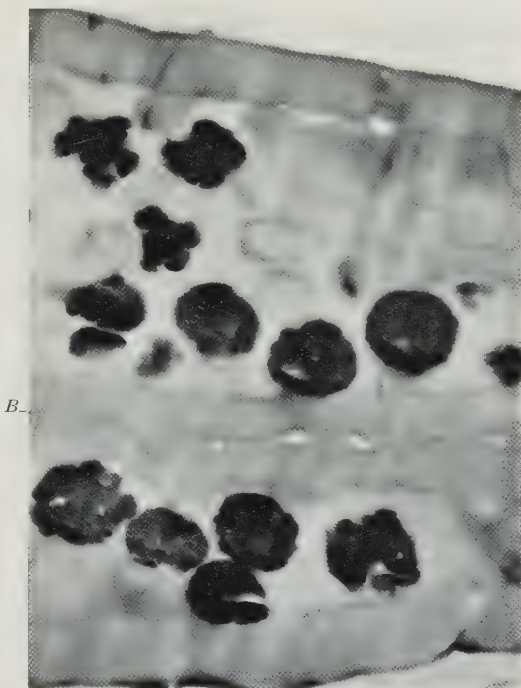


Abb. 3. *Columba trocaz*, Überlappungsgebiet zweier Radialzellen. 15 000:1. B Kontaktfläche der beiden Zellen

vielmehr oft etwas unregelmäßig und manchmal mehr oder weniger aufgeraut oder gar gelappt. Freilich handelt es sich dabei z. T. um künstliche Deformation (Abb. 5, 6). Der Durchmesser der Körner im Schnittbild schwankt beträchtlich. Da die Schnittdicke ($0,1\ \mu$) unter der mittleren Größe der Granula ($1\text{--}3\ \mu$) liegt, werden in den Bildern nie ganze Granula, sondern nur beliebige Scheiben und sehr selten tangentielle Anschnitte der kugeligen Gebilde vorliegen. Zur mathematischen Bestimmung der Größenverteilung von Kugeln aus den Schnittkreisen sei auf F. LENZ (1956) verwiesen.

Die Elektronenstreuung der Granula ist sehr stark, stellen sie sich doch gegenüber den anderen Anteilen der Zelle tiefgeschwärtzt im Bilde dar, eine Folge

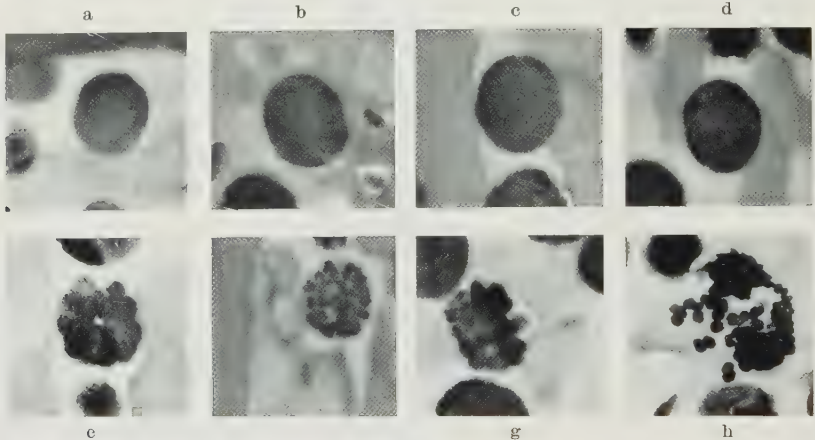


Abb. 4a—h. *Columba trocaz*, Struktur der Pigmentgranula, 15 000:1. a—d feinstgekornte Granula; e—h Aufbau von Sekundärgranulen aus größeren und feineren „Primärgranula“, von denen in h einige völlig isoliert liegen

ihrer Massendichte, die mit ihrer ungemein hohen Brechzahl (W. J. SCHMIDT 1961 b) harmonisiert.

Die Granula zeigen im Elektronenmikroskop *Strukturen*: Manche bieten sich *feinstpunktiert* dar (Abb. 4a—d), andere aber (e—h) erweisen sich aus *rundlichen Körnchen* aufgebaut, die wir als „*Primärgranula*“ bezeichnen wollen. Diese liefern, zu einem kugeligen Häufchen dicht geballt, *Sekundärgranula*. Die *Größe* der Primärgranula ist im gleichen Sekundärgranulum einigermaßen dieselbe, in verschiedenen aber wechselt sie beträchtlich (Abb. 4e—h), womit auch ihre *Zahl* beim Aufbau gleich großer Sekundärgranula sich ändert; sie mag in der Scheibe des Mikrotomschnitts von einem Dutzend bis zu 100 und mehr betragen. Größere, also in geringer Zahl das Sekundärgranulum aufbauende Primärgranula lassen sich auch bei völlig ungestörter Struktur der Sekundärgranula sicher erkennen (Abb. 4e—f). In dem Maße, wie die Primärgranula kleiner und damit im einzelnen Sekundärgranulum zahlreicher werden, gestaltet sich ihre Erfassung schwieriger; sind aber solche Sekundärgranula unter der Messerwirkung oder aus anderen Gründen auseinandergebrochen, so sieht man einzelne Primärgranula (Abb. 4h) völlig isoliert.

Wesen von Primär- und Sekundärgranula und deren Beziehung zu den feinstpunktierten Granulen bleiben dunkel und lassen sich wohl nur durch entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen klären.

Nach BIRBECK und BARNICOT (1959) geht in schwarzen menschlichen Haaren die *Bildung der Pigmentgranula* von Bläschen der Golgi-Zone aus, in deren Oberfläche sich konzentrisch angeordnete oder unregelmäßig gefaltete Grenzmembranen differenzieren. Die Dicke und Dichte der inneren Membranen dieser „Praegranula“ nimmt zu, so daß die fertigen Gebilde einheitlich dicht und strukturlos werden. Das erstgebildete dichte Material hat aber feinkörnigen Charakter; einige ähnlich dichte Partikel können sich auch noch an der Oberfläche fertiger Granula finden. Es scheint, daß die erste Anlage aus Protein besteht und daß dann darin das Melaninpolymer eingelagert wird. In den Haarfollikeln menschlicher *Albinos* finden sich Melanocyten mit Granula, die an die Körnchen unreifer schwarzer Haare erinnern, jedoch geringe Dichte zeigen. So dürften Albinos die membranöse Matrix der Pigmentgranula wie bei schwarzen Haaren bilden, aber infolge des Fehlens oder der Hemmung von Tyrosinase unfähig sein, das Melaninpolymer darin abzulagern. Die ovalen Melaningranula roter Haare entstehen in ähnlicher Art wie die schwarzer. Bei *blonden* Haaren zeigen die Melaningranula in Melanocyten und Rindenzellen scharf ausgebildete lamelläre Struktur, ähnlich jener in der Entwicklungsgeschichte der schwarzen Haare. Die Melanisierung scheint also bei blonden Haaren unvollständig zu sein. Nach WEISSENFELS (1956) entstehen die Pro-Pigmentgranula nicht in Golgi-Apparat, Kern oder Mitochondrien, sondern in bisher unbeachtet gebliebenen Plasmabezirken.

So muß dahingestellt bleiben, ob vielleicht bei den feinpunktierten großen Granula (Abb. 4a—d) sehr kleine Primärgranula in ungemein großer Zahl vorliegen. Aber auch das Gegenteil wäre denkbar, daß nämlich die feinpunktierten Granula einzelnen, riesig herangewachsenen Primärgranula entsprechen. Ob man aus den vorliegenden Unterschieden im Aufbau der Sekundärgranula schließen darf, den Primärgranula komme Wachstumsvermögen zu und sie seien auf verschiedenen Größen- bzw. Altersstufen von dem Absterben der Zelle im Verhornungsprozeß überrascht worden, bleibt fraglich.

Von verwandten elektronenmikroskopischen Beobachtungen an Pigmentgranula seien zunächst die von SEBRUYN (1950) und SEBRUYN und LAGASSE (1951) erwähnt. Die Autoren fanden, daß die stäbchenförmigen Pigmentgranula im Tapetum nigrum (Retinaepithel) der Augen von *Mensch* und *Rind* aus einigen hundert von „Mikro-Pigmentgranula“ zusammengesetzt sind, die sich in einer sackartigen Hülle befinden. Diese Beobachtungen wurden nach Behandlung von Stücken des Pigmentepithels mit 4%igem Chloramin T gemacht. WEISSENFELS (1956) bringt ein elektronenmikroskopisches Bild von Pigmentkörnern aus Melano-

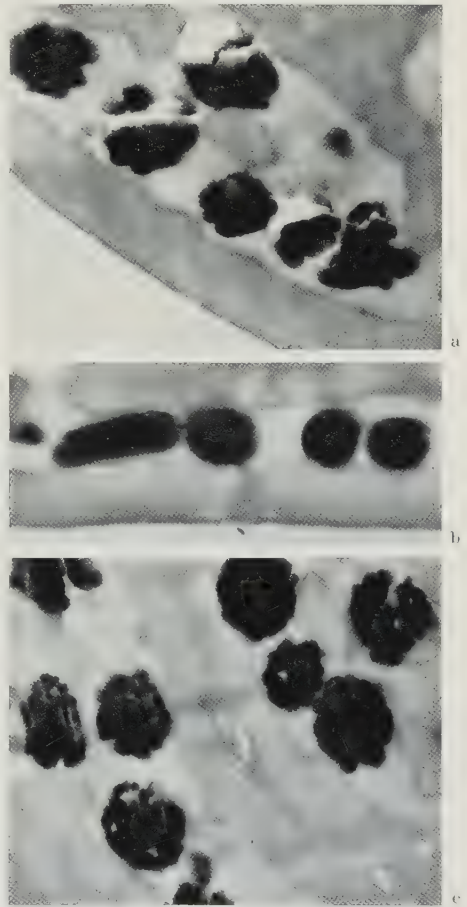


Abb. 5 a—c. *Columba trocaz*, Deformation der Pigmentgranula durch Wirkung des Mikrotommessers, dessen Bewegungsrichtung in a und b vertikal, in c horizontal im Bilde liegt. 15 000:1. a Grobe Verletzung der Granula unter Kompression von Teilen; b elliptische bis scheibenförmige Deformation; c Deformation unter Orientierung der Sekundärgranula

blasten in explantiertem Gewebe (Lumbal- und Halsregion) von *Seidenhühnerembryonen*, die „helle Vacuolen“ zeigen. BODINGBAUER und KLIMA (1960) geben nach WEINBERGER (1957)

elektronenmikroskopische Bilder von Pigmentkörnern in schwarzen und braunen Haaren des Dobermannhundes; bei den ersten war keine oder nur eine sehr undeutliche Struktur zu erkennen, bei den letzten aber zeigte sich ein *körniger Aufbau* mit dichter Außenzone und mehr oder weniger ausgedehntem hellem Zentrum, weiter eine verdichtete Grenzlinie. Demnach wären die verschiedenen Farbvarianten der Haare nicht nur Folge der unterschiedlichen Dichte und Anordnung der Granula, sondern auch durch strukturelle Unterschiede der Einzelkörner bedingt. Über die Entwicklung und Struktur von Melanin granula *menschlicher* Haare berichten BIRBECK und BARNICOT (1959, siehe oben). Nach NIESSEN (1958), der die länglich ovoiden Melanin granula in den „eigentlichen Federzellen“ (Kästchenzellen des Markes) von *Melopsittacus* elektronenmikroskopisch untersuchte, soll sich ein farbloser Pigmentträger nachweisen lassen, der bei unvollständiger Ausfärbung (Albinos, Isabellen) zerfällt und sich vollkommen rückbildet; die beigegefügtten Bilder belegen das aber nicht überzeugend.

An manchen Stellen der Bilder begegnet man Pigmentkörnern, die unter Wirkung des Mikrotommessers *deformiert* wurden. Teils sind die so entstandenen Veränderungen grober Art (Abb. 5a), indem der Umriß der Granula mannigfach verunstaltet

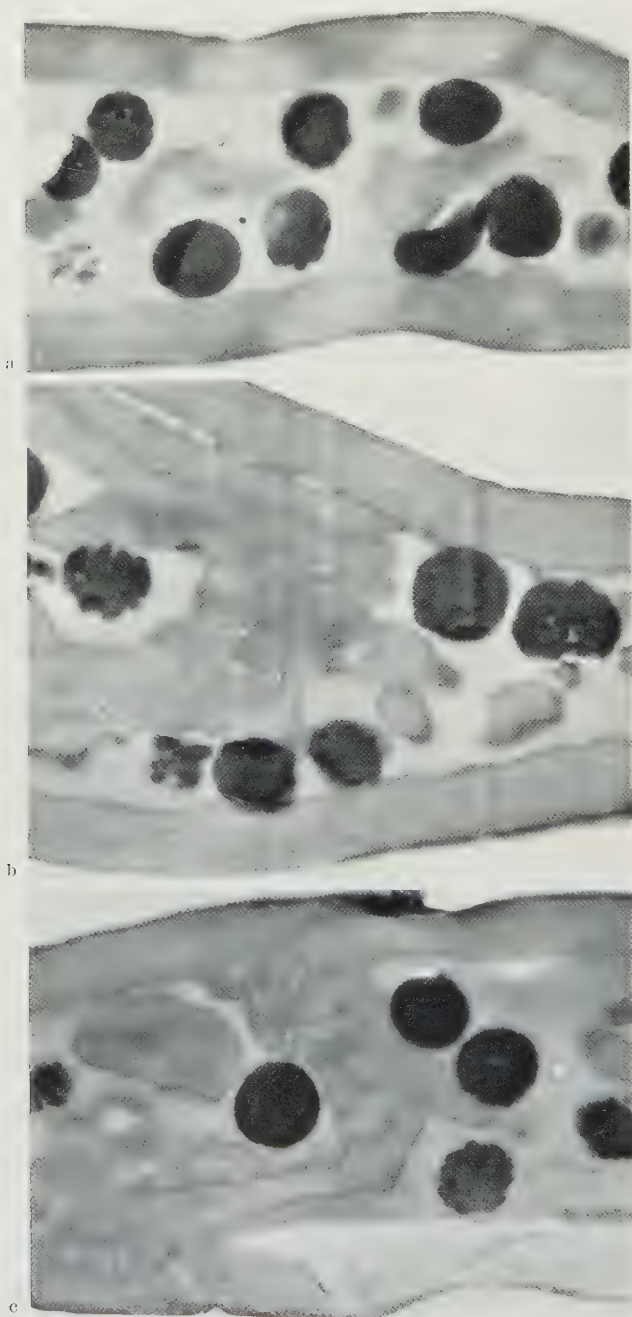


Abb. 6a—c. *Columba trocaz*, „intramoeniale“ Tonofibrillenbündel. 15 000:1. a Rundliche und unregelmäßige Bündeldurchschnitte; b vereinzelte und dicht zusammengedrückte Durchschnitte; c dichtgedrückte Durchschnitte, an der Grenze zweier Zellen mit dem Keratinmantel zusammenhängend

erscheint, z. B. lappige Fortsätze darbietet; ja bisweilen wurden Stücke der Granula aus dem Schnitt herausgerissen. In anderen Fällen aber (Abb. 5b) zeigt sich der ursprüngliche kreisförmige Umriß der Granula elliptisch oder gar stäbig verformt. Dabei liegt die größte Achse des deformierten Gebildes stets senkrecht zur Messerführung, deren Wirkung somit als Druck aufzufassen ist. Solche Befunde lehren, daß das Granulum als Ganzes nicht etwa spröde ist, sondern eine gewisse Plastizität besitzt.

Besonderes Interesse verlangt die Wirkung der Deformation bei solchen Pigmentkörnern, die einen Aufbau aus Primärgranula deutlich erkennen lassen. Hier sieht man nämlich (Abb. 5 links) die *Primärgranula* öfter in *Parallelreihen* geordnet, so daß das Sekundärgranulum eine Art Streifung¹ darbietet, die stets senkrecht zur Messerführung steht. Bisweilen scheint es, als ob auch die Primärgranula selbst Deformation erlitten, denn hier und da erscheinen sie innerhalb eines Streifens „verschmiert“.

Jedenfalls lehren diese Beobachtungen, daß die vom Messer hervorgerufene, schon im Lichtmikroskop an verändertem Umriß der Granula kenntliche Deformation zu einer *Orientierung* der Primärgranula führen kann, vielleicht auch zu Formänderung und struktureller Orientierung an letzten. Damit entstehen submikroskopische Strukturen, die Doppelbrechung erwarten lassen, mag es sich nun um die Wirkung eines Wienerschen Mischkörpers handeln, also um Formdoppelbrechung, oder aber um Eigendoppelbrechung der deformierten Primärgranula, die durch ihre Orientierung zum Vorschein kommt. Im ersten Falle ist freilich Voraussetzung, daß die Primärgranula durch ein Medium von abweichender Brechzahl geschieden sind, eine Bedingung, die angesichts des ungemein hohen Brechungsindex der Granula ($n \sim 2$) praktisch von jedem in der Mikroskopie üblichen Einbettungsmittel oder auch von Luft erfüllt wird. Aber auch Zusammenwirken von Form- und Eigendoppelbrechung bleibt möglich. Eine nähere Analyse dieser Verhältnisse im Polarisationsmikroskop wird bei der Kleinheit der Granula auf große Schwierigkeiten stoßen.

Der vom Keratinmantel umschlossene *intramoenialem Raum* enthält nach dem lichtmikroskopischen Befund außer den Granula *Luft*, die sich leicht durch Flüssigkeiten verdrängen läßt (W. J. SCHMIDT 1949). Elektronenmikroskopisch zeigt sich jedoch hier noch ein weiteres Material in *rundlichen* oder *länglichen Durchschnitten* (Abb. 6a, b), die manchmal mosaikartig dicht aneinanderliegen (Abb. 6b, c), wobei öfter nur kleinste Lücken bleiben (Abb. 6b). Sie sind als *intramoenialem Tonofibrillenbündel* aufzufassen, die vom Keratinmantel abzweigen (Abb. 6c). Dafür spricht auch, daß die Elektronenstreuung dieser Bündel dieselbe ist wie beim Keratinmantel (s. Abb. 6a, b). Diesen Tonofibrillenbündeln, die den intramoenialen Raum stets nur teilweise erfüllen, fehlt die strenge Parallelordnung, wie sie im Keratinmantel gemäß der Polarisationsoptik vorliegt.

Zum Schluß seien noch einige Bemerkungen über die *nichtschillernden Federstrahlen* der *Columba trocaz* gemacht. Das verarbeitete *braune* Material wurde

¹ Auch bei EAKINE und WESTFALL (1960) und bei EAKINE, QUAY und WESTFALL (1961) finden sich elektronenmikroskopische Bilder von Pigmentkörnern aus dem Parietalaue von *Sceleporus* mit den hier beschriebenen Deformationserscheinungen, besonders typisch ausgeprägt an erst genannter Stelle in der nicht mit Nummer versehenen Abbildung auf S. 487; hier erscheinen die Granula ganz regelmäßig quergestreift.

dem gleichen Federchen entnommen wie die untersuchten schillernden Strahlen, jedoch mehr basal. Hier zeigt sich sehr eindrucksvoll — was auch bereits aus lichtmikroskopischen Beobachtungen zu entnehmen war —, daß mit dem *Schwund des Schillerns* der intramoeniale *Luftraum* mehr und mehr sich einengt,

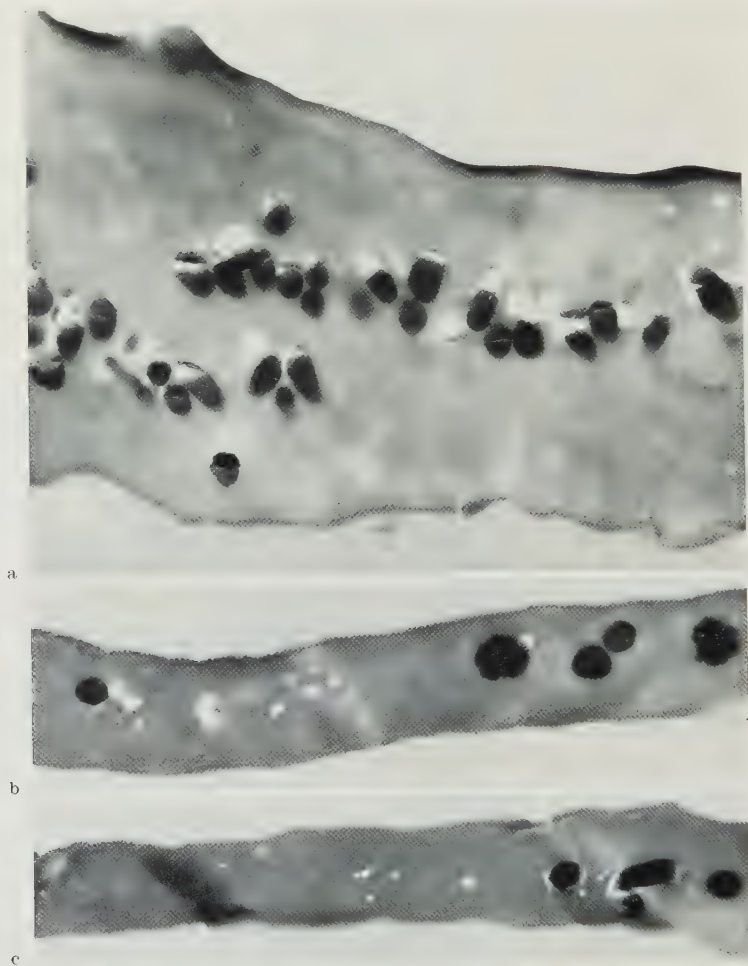


Abb. 7a—c. *Columba trocaz*, Querschnitte von Radien aus dem nichtschillernden Gebiet, 15 000:1. a Intramoenialer Raum auf Lücken eingengt, Verschwinden der Differenzierung zwischen Keratinmantel und intramoenialen Tonofibrillenbündeln; b, c dünne fast granulafreie Abschnitte von Strahlen, Keratinmasse nur noch mit kleinsten Lücken

so daß die Pigmentgranula vielfach dicht von der Hornmasse umschlossen werden (Abb. 7a). Zugleich damit geht die Differenzierung der Hornmasse in Keratinmantel und intramoeniale Tonofibrillenbündel verloren. In den dünn auslaufenden Abschnitten der Strahlen, die fast keine Pigmentkörner mehr enthalten (Abb. 7b, c), zeigt sich die Keratinmasse nur noch von kleinen, oft runden im Leben luftführenden Lücken durchbrochen. Luft in Längsspalten des Keratins ist auch für Federstrahlen mit anderen Pigmenten bekannt (W. J. SCHMIDT 1961a).

Die Pigmentgranula sind in den nichtschillernden Bereichen der Feder vielfach kleiner als in den schillernden, wie ja oft festzustellen ist, daß die Größe der Pigmentgranula proximalwärts an der Feder abnimmt.

Zugleich aber treten vor allem in der Rinde der Federäste gestreckte, ellip-tische oder stäbige Formen auf (Abb. 8 a, b). In manchen Granula sieht man feine stichartige helle Lücken (Abb. 8 a, rechts), die vielleicht auf einen Aufbau des Pigmentkornes aus Primärgranula zu beziehen sind. Typischen Ballungen von Primär- zu Sekundärgranula, wie sie im schillernden Federteil häufig sind, begegnet man aber selten (Abb. 7 b, rechts).

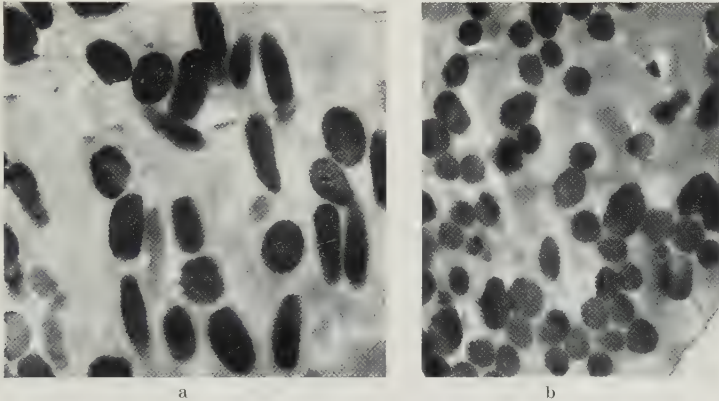


Abb. 8 a u. b. *Columba trocaz*. Granula aus dem nichtschillernden Gebiet, 15 000:1. a Zum Teil stäbige Formen; b rundliche unregelmäßig kantige Formen, größtenteils unmittelbar vom Keratin umschlossen, das noch Andeutungen seines Aufbaues aus Tonofibrillenbündeln erkennen läßt

Es wird verständlich, daß bei dem dichten Bau des Keratins nichtschillernder Strahlen das Einbettungsmittel in den geringfügigen Lücken zwischen den Körnern und um sie herum nicht mehr nachweisbar ist.

Zusammenfassung

Die rostbraunen kugeligen 1—3 μ großen *Phaeomelaninkörnchen* in den Zellen schillernder Federstrahlen von *Columba trocaz* erweisen sich, im Elektronenmikroskop an Schnitten von 0,1 μ Dicke untersucht, teils als einheitliche, jedoch *feinpunktierte Gebilde*, teils aber als dichte *Ballungen rundlicher „Primärgranula“*, deren Größe und damit auch Zahl für die einzelnen „Sekundärgranulen“ erheblich schwankt.

Durch Messerwirkung kommt es zu *Deformation* der Granula, die bei den Sekundärgranulen *streifige Struktur* (Reihenordnung und Verschmieren der Primärgranula) herbeiführen kann. Die so erzeugte feinbauliche Ordnung ist als Ursache der Doppelbrechung anzusehen, die deformierte Granula im Polarisationsmikroskop darbieten.

Der etwa 0,5 μ dicke, zur Länge des Federstrahles positiv doppelbrechende *Keratinmantel* der Radienzellen erscheint im Elektronenmikroskop homogen, glatt und von einer *Grenzmembran* überzogen. In dem von ihm umschlossenen, im natürlichen Zustande lufthaltigen *intramoenialen Raum* finden sich neben den beschriebenen Granulen strangartige Massen, teils vereinzelt, stellenweise auch

dichtgefügt und im Zusammenhang mit dem Keratinmantel, die *intramoenialen Tonofibrillenbündel*.

Nichtschillernden Federstrahlen fehlt (bis auf feine Lücken) der intramoeniale Raum und damit eine zusammenhängende Luftmasse; die meist kleineren Phaeomelaningranula werden unmittelbar vom Keratinum geschlossen; damit geht die Differenzierung der Keratinmasse in Mantel und intramoeniale Tonofibrillenbündel verloren.

Literatur

- BIRBECK, M. S. C., and N. A. BARNICOT: Electron microscope studies on pigment formation in human hair follicles. In: *Pigment cell biology*, edit. by M. GORDON, p. 549—561. New York 1959.
- BODINGBAUER J., u. J. KLIMA: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Feinbau des Hundehaares (Dobermann) unter Berücksichtigung von geschlechts- und umweltbedingten Einflüssen. *Mikroskopie* **15**, 20—29 (1960).
- EAKINE, R. M., W. B. QUAY and J. A. WESTFALL: Cytochemical and cytological studies of the parietal eye of the lizard, *Sceleporus occidentalis*. *Z. Zellforsch.* **53**, 449—470 (1961).
- , and J. A. WESTFALL: Further observations on the fine structure of the parietal eye of lizards. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 483—499 (1960).
- LENZ, F.: Zur Größenverteilung von Kugelschnitten. *Z. wiss. Mikr.* **63**, 50—56 (1956).
- MATTERN, I.: Zur Histologie und Histochemie der lipochromatischen Federn einiger Cotingiden (Schmuckvögel). *Z. Zellforsch.* **45**, 96—136 (1956).
- NIESSEN, TH.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen des melanotischen Pigments in der Feder des normalen und albinotischen Wellensittichs (*Melopsittacus undulatus* SHAW). *Mikroskopie* **13**, 1—24 (1958).
- PHILIP, D., G. LANGERMALEN and N. GRALÉN: Surface structure of feathers from the white domestic fowl. *Nature (Lond.)* **166**, 1070—1071 (1950).
- — — Electron microscopy of the surface structure of feather. *Biochem. biophys. Acta* **6**, 494—507 (1951).
- SCHMIDT, W. J.: Altes und Neues über Strukturfarben im Tierreich. *Gießener Naturwiss. Vorträge*, Heft 6, 71 S., 1949.
- Wie entstehen die Schillerfarben der Federn? *Naturwissenschaften* **39**, 313—318 (1952).
- Über luftführende Federstrahlen beim Blutfasan (*Ithaginis sinensis*) nebst Bemerkungen über Luftgehalt von Federn überhaupt. *J. Ornithol.* **102**, 34—40 (1961a).
- Über künstliche Erzeugung von Doppelbrechung an den kugeligen rostbraunen Melaningranula der Taube *Columba trocaz*. *Anat. Anz.* **109**, 192—200 (1961b).
- SEBRUYNS, M.: Etude, au microscope électronique, de l'ultrastructure des grains pigmentaires de l'épithélium rétinien. *Ann. Oculist. (Paris)* **183**, 393—399 (1950).
- , u. A. LAGASSE: Beiträge zum Studium der Ultrastruktur der Pigmentkörner mit Hilfe des Elektronenmikroskopes. *Mikroskopie* **6**, 237—241 (1951).
- WEINBERGER, F.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Pigment und seine Lagerung im Haar des Dobermannhundes. Inaug.-Diss. Tierärztliche Hochschule Wien 1957.
- WEISENFELS, N.: Licht-, phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung der Propigment-Granula in Melanoblastenkulturen. *Z. Zellforsch.* **45**, 60—73 (1956).

Prof. Dr. W. J. SCHMIDT,
Gießen, Zoologisches Institut der Universität, Ludwigstr. 23

Prof. Dr. H. RUSKA,
Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie der Med. Akademie Düsseldorf,
Moorenstr. 5

Aus dem Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie in Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. H. MEESSEN)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DES *TRYPANOSOMA CRUZI* MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES PERIPLASTEN UND DES BLEPHAROPLASTEN*

Von

HERIBERT SCHULZ und EDUARDO MACCLURE

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Mai 1961)

CARLOS CHAGAS entdeckte 1909 in den Holz- und Lehmhütten der Landbevölkerung Brasiliens im Darm von blutsaugenden Raubwanzen Flagellaten mit Merkmalen der Gattung *Crithidia*. Er stellte fest, daß es sich bei diesen Flagellaten um Entwicklungsstadien einer neuen Trypanosomenart handelte, die CHAGAS zu Ehren seines Lehrers und Freundes OSWALDO CRUZ „*Trypanosoma Cruzi*“ nannte. In experimentellen Untersuchungen gelang CHAGAS die Übertragung der Infektion durch Raubwanzen, und er fand 1911 erstmalig bei Blutuntersuchungen eines akut fieberhaft erkrankten Kindes, daß es sich um eine menschliche Trypanosomen-Erkrankung handelte.

Die wichtigste Rolle dieser nach CHAGAS benannten Krankheit, einer der verbreitesten Volksseuchen Südamerikas, spielen die Herzveränderungen. Eine Beschreibung der klinischen Erscheinungsformen und der pathologischen Anatomie der Chagas-Krankheit, besonders der Chagas-Karditis, gibt KÖBERLE (1959). Die licht- und elektronenmikroskopisch feststellbaren Veränderungen des Herzmuskels und der Blutkapillaren bei der experimentellen Chagas-Myokarditis der weißen Maus wurden von MACCLURE und POCHE (1960) mitgeteilt.

Über die Biologie des *Trypanosoma Cruzi* hat ELKELES (1959) auf Grund lichtmikroskopischer Beobachtungen kürzlich ausführlich berichtet. Weitere zusammenfassende Darstellungen über die Morphologie und den Formenwechsel von *Trypanosoma Cruzi* finden sich bei PIEKARSKI (1954) sowie bei GEIGY und HERBIG (1955). Die ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *Trypanosoma Cruzi* in der Gewebekultur und in der Blut-Agar-Form wurden von MEYER und PORTER (1953) sowie von MEYER, DE OLIVEIRA MUSACCHIO und DE ANDRADE MENDONÇA (1958) durchgeführt.

Mit verbesserten Methoden war es uns möglich, die *Ultrastruktur der Parasiten* in der *Trypanosoma*-form und in der *Leishmania*-form weiter aufzuklären. In der vorliegenden Arbeit soll zusammenfassend über das elektronenmikroskopische Bild der verschiedenen Erscheinungsformen von *Trypanosoma Cruzi* berichtet werden. Hierbei berücksichtigen wir besonders die Ultrastruktur des *Periplasten* und des *Blepharoplasten*.

Material und Methode

a) Agar-Kultur. Ein brasilianischer Stamm von *Trypanosoma Cruzi*¹ wurde auf NN-Schräggagar (nach NOVY und MCNEAL: Rindfleischextrakt, Agar, Pepton, Kochsalz und n/1-Sodalösung) beimpft und bei + 37° C bebrütet. Die Trypanosomen wurden aus dem Kondenswasser des Nährbodens in flüssigem Korthofschem Nährmedium aufgeschwemmt, mit gepufferter 1%iger Osmiumsäurelösung (pH 7,4) nach PALADE (1952) zweimal 15 min bei

* Die Befunde wurden auf der 28. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Düsseldorf am 2. 5. 1961 von H. SCHULZ vorgetragen.

¹ Der Stamm von *Trypanosoma Cruzi* wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. L. BOGLIOLO, Pathologisches Institut, Belo Horizonte, Brasilien, zur Verfügung gestellt.

— 28° C fixiert und bei 15000 U/min 8 min zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit Tyrode-Lösung wurde das Material in Azeton entwässert und in Vestopal-W (RYTER und KELLENBERGER 1958) bei + 60° C eingebettet. 200—350 Å dünne Schnitte wurden mit dem Porter-Blum-Ultramikrotom hergestellt. Elektronenmikroskopische Untersuchung mit einem RCA-EMU-3C-Elektronenmikroskop bei einer Strahlspannung von 50 kV. Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden auf Kodak-Platten (Lantern Slide, Medium) aufgenommen. Die elektronenoptische Originalvergrößerung und die photographische Nachvergrößerung sind in den Legenden der Abbildungen angegeben.

b) **Mäuse.** Sieben mit *Trypanosoma Cruzi* infizierte, erwachsene weiße Mäuse¹ wurden nach 14—20 Tagen in Äthernarkose durch Eröffnung des Thorax und sofortige Herausnahme des Herzens getötet. Kleine Herzmuskelstückchen von 1 mm Kantenlänge wurden bei + 4° C 1 Std in 1%iger gepufferter Osmiumsäurelösung (pH 7,4) nach PALADE (1952) fixiert, anschließend gewaschen, in Azeton entwässert und in Vestopal-W (RYTER und KELLENBERGER 1958) bei + 60° C eingebettet. Es wurden ultradünne Schnitte elektronenmikroskopisch untersucht. Außerdem wurde Herzmuskelgewebe zur lichtmikroskopischen und histochemischen Untersuchung in 10%igem Formalin fixiert.

c) **Histochemische Untersuchung.** Für die histochemische Untersuchung verwandten wir Herzmuskelgewebe und trockene Blutaussstriche der infizierten Maus. Prüfung auf Polysaccharide: PAS-Reaktion ohne und mit Behandlung von Speichelenzymen (15 min bei + 56° C); Toluidinblau-Metachromasie-Reaktion. Kontrolle auf Lipide: Sudan-Schwarz-B. Weiterhin färbten wir Herzmuskelgewebe und Blutaussstriche mit Hämatoxylin-Eosin, mit der Giemsa-Methode und mit der Nuklealreaktion nach FEULGEN.

Befunde

1. Elektronenmikroskopische Befunde

a) ***Trypanosoma Cruzi* in der Agar-Kultur.** Die schlanken, spindelförmigen Parasiten der Agar-Kultur sind durchschnittlich 14—20 μ lang. In unseren Agar-Kulturen fanden wir vorwiegend die Crithidia- und die *Trypanosoma*-form. Bei der Crithidiaform liegt der Blepharoplast meist in Zellmitte dicht neben dem Zellkern, bei der *Trypanosoma*-form dagegen vor der seitlich austretenden Geißel an einem Ende des Parasiten.

Der *Zellkern* der Parasiten hat eine feingranuläre Struktur und zeigt hellere und dunklere Bereiche. Die Granula sind etwa 60—100 Å im Durchmesser groß. Die Nukleolen sind klein. Mitosen wurden nicht gefunden. Die Chromatinsubstanz ist aufgelockert, an manchen Stellen aber an der Innenseite der primären Kernmembran angereichert (Abb. 1). Der Abstand zwischen der primären und der sekundären Kernmembran ist regelrecht. Hin und wieder finden sich feine in das Zytoplasma reichende Vorstülpungen der sekundären Kernmembran.

Die Zellmembran von *Trypanosoma Cruzi*, die bei den Hämoflagellaten auch *Perioplast* genannt wird, besteht aus einer 130 Å dicken, dreigeschichteten Membran und den unmittelbar darunterliegenden Fibrillen (Abb. 2 und 3). Jede der beiden osmiophilen Membranschichten des Perioplasten ist 45 Å dick; die osmiophobe Mittelschicht mißt 40 Å. Die Fibrillen (Durchmesser 200—210 Å) liegen als wandverstärkende Röhren unmittelbar an der Innenfläche der Hüllmembran. Der helle rohrförmige Innenraum der Fibrillen beträgt im Querdurchmesser 90—100 Å. Der seitliche Abstand von Fibrille zu Fibrille beträgt etwa 320 Å, im Bereich der Geißelbasis ist er kleiner. Der Abstand zwischen Fibrillen und

¹ Die infizierten Mäuse wurden uns von Herrn Doz. Dr. R. GÖNNERT, Chemotherapeutisches Institut der Farbenfabriken Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld, überlassen.

Herrn Prof. Dr. L. BOGLIOLO und Herrn Doz. Dr. R. GÖNNERT danken wir an dieser Stelle für ihr Entgegenkommen herzlich.

Hüllmembran ist außerordentlich gering; meist liegen die Fibrillen unmittelbar der Zellwand an. Die Fibrillen stellen selbständige Bauelemente des Periplasten

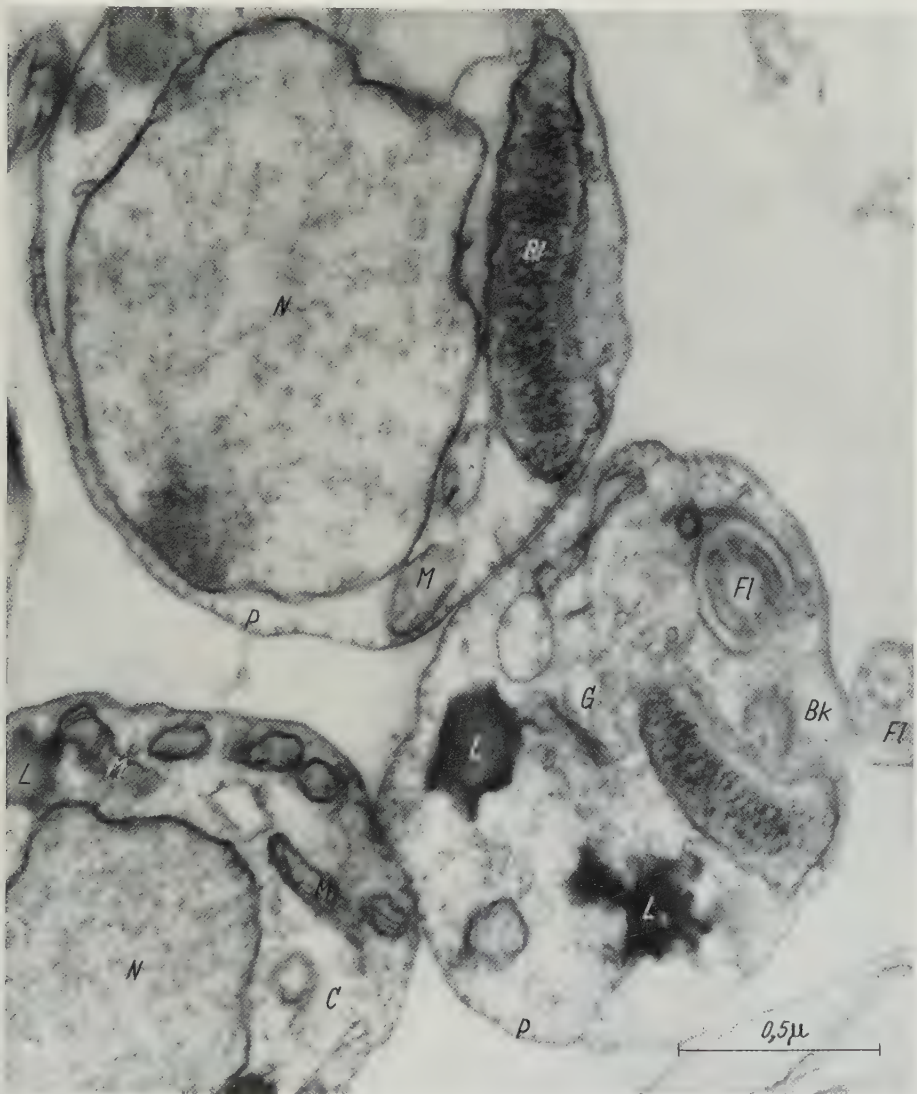


Abb. 1. *Trypanosoma Cruzi* aus der Agar-Kultur. Übersicht. *N* Zellkerne mit aufgelockerter Chromatinsubstanz. Stellenweise ist die Chromatinsubstanz an der Innenseite der Kernmembran angereichert. *BL* Blepharoplast; *BK* schräggeschnittenes Basalkörperchen; *FI* quergeschnittenes Flagellum; *C* Centriol (?); *G* Golgi-Zone; *L* Fetttropfen; *M* Mitochondrien; *P* Periplast mit quergeschnittenen Fibrillen.

Archiv-Nr.: 1213 C/59. Elektronenmikroskopische Vergr. 16140:1, Abb. 61400:1

dar und sind nicht kontinuierlich mit der inneren osmiophilen Schicht der Zellmembran verbunden. Die Querschnitte der Fibrillen sind rund und haben eine helle Innenzone (Abb. 2 und 8b). In Längs- und Tangentialschnitten erkennt man dagegen eine deutliche fibrilläre Struktur (Abb. 7b, 16 und 17). In manchen Wandbereichen können die Fibrillen auch fehlen.

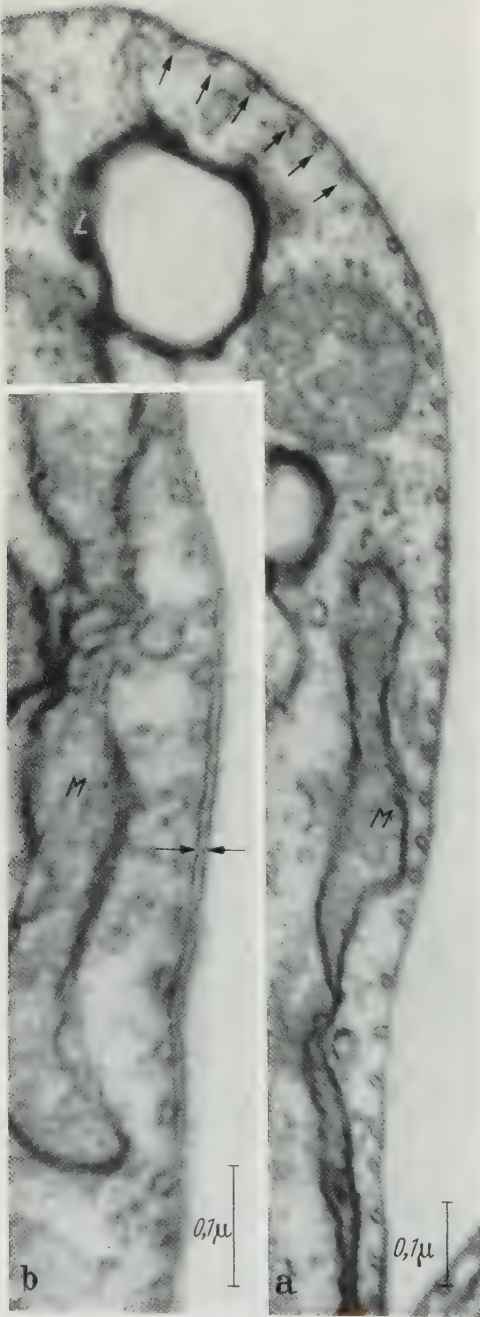


Abb. 2a u. b. Ausschnitte des Periplasten von *Trypanosoma cruzi* aus der Agar-Kultur. Die Pfeile (\rightarrow) in Abb. 2a deuten auf quergeschnittene Fibrillen unmittelbar an der Innenseite der Hüllmembran. Fibrillen sind innen hell. Bei den Pfeilen ($\rightarrow \leftarrow$) in Abb. 2b die 130 Å dicke dreigeschichtete Hüllmembran des Periplasten. *M* langgestreckte Mitochondrien; *L* Fetttropfen. Archiv-Nr.: a) 1198 D/59, b) 1881 E/60. Elektronenmikroskopische Vergr.: a) 16140:1, b) 20000:1. Abb.: a) 100800:1, b) 146000:1

In Höhe des Austrittes der Geißel ist der Periplast eingebuchtet und geht kontinuierlich in die Hülle der Geißel über. Auf den Abb. 4b und c (Pfeile) erkennt man auch in der Hülle des Flagellum die doppelt-konturierten Membranen des Periplasten; die Fibrillen des Periplasten finden sich aber nicht mehr in der Geißelwand. In Höhe des Austrittes der Geißel sind die Membranen des Periplasten an der Umschlagstelle außerdem etwas dilatiert. Dadurch entsteht an der Geißelmündung ein extrazytoplasmatischer ringförmiger Schlauch, der besonders gut auf den Abb. 5, 6 und 11 zu sehen ist. Die Geißel stellt sich bei allen Parasiten der Agar-Kultur als freie Struktur dar. In Abb. 4a ist das seitlich aus der Zelle austretende Flagellum schräg-geschnitten, in Abb. 5 längs- und in den Abb. 4b und c quergeschnitten. Im Flagellum finden sich neun peripher gelegene und zwei zentral gelegene Filamente. Jedes Filament setzt sich aus zwei Subfilamenten zusammen. Die peripheren Filamente reichen bis in das Basalkörperchen hinein, die zentralen Filamente nicht (Abb. 4b). Auf Abb. 6 erkennt man in den Geißeln zwischen den Basalkörperchen und den distal gelegenen Filamenten durch eine Membran begrenzte Kammern. In einem Flagellum ist an der distalen Seite der Kammer offenbar ein zentrales Filament nieten- oder schraubenförmig mit der Kammerwand befestigt. Diesen Befund konnten wir aber bisher nur ein einziges Mal beobachten.

Das *Basalkörperchen* liegt an der Geißelbasis und stellt ein selbständiges Gebilde dar. Bei den begeißelten Parasiten findet es sich regelmäßig vor der zur Geißelbasis gerichteten Oberfläche des Blepharoplasten. Das Basalkörperchen ist durch seine Lage und Struktur gut vom Blepharoplast zu unterscheiden. In das Basalkörperchen führen die peripheren Filamente der Geißel. Auf Abb. 5 erkennt man um das Basalkörperchen herum zwei perikorpuskuläre Satelliten, die sog. Tochterkörperchen; sie sind mit ihren Filamenten quer zur Längsachse des Basalkörperchens angeordnet.

Der *Blepharoplast* ist ein etwas gekrümmter scheibenförmiger Körper mit einem Längsdurchmesser von 0,75 bis 1,35 μ und einem Querdurchmesser von 0,2—0,3 μ . Die größte Länge gilt für Teilungsformen. Der Blepharoplast der *Trypanosoma*-, der *Crithidia*- und der *Leptomonas*-form liegt gemeinsam mit dem Basalkörperchen und den Centriolen an der Geißelbasis. Auf den Abb. 5—7 ist der Blepharoplast *quer* zur Längsachse geschnitten. Diese Bilder des „länglichen“, etwas gekrümmten Blepharoplasten haben wir am häufigsten gesehen, weil der Blepharoplast wegen seiner scheibenförmigen Struktur meist quer durchschnitten

wird. Wenn er im Schnitt länglich, aber etwas kürzer erscheint, so handelt es sich auch um quer zur Längsachse getroffene Blepharoplasten. Hierbei liegen aber die Schnitte in den seitlichen Anteilen der Scheibenperipherie und stellen Anschnitte des Blepharoplasten dar. Auf Abb. 8a—d ist der Blepharoplast vorwiegend *parallel* zur Längsachse geschnitten. Dieses Bild des „runden“ Blepharoplasten kommt in ultradünnen Schnitten selten vor, weil die Schnittrichtung nur selten parallel zur Längsachse dieses 0,2—0,3 μ flachen, scheibenförmigen Gebildes verläuft. Im Innern des Blepharoplasten finden sich helixförmig angeordnete 125 Å dicke Fibrillen. Die osmiophile Membran der quergeschnittenen Fibrillen mißt 45 Å, die rohrförmige helle Innenzone 35 Å. Längsgeschnittene Fibrillen lassen keine Innenzone erkennen; sie sind geschlängelt und berühren einander oft. Die Höhe der Fibrillen beträgt 0,12—0,13 μ . Die Hülle des Blepharoplasten besteht aus einer mitochondrienähnlichen, 140—160 Å dicken Doppelmembran, die an einigen Stellen Cristae zeigt. Ihre beiden osmiophilen Membranschichten sind je 50 Å, die helle Mittelschicht meist 40—60 Å dick, gelegentlich aber auch dicker. Die

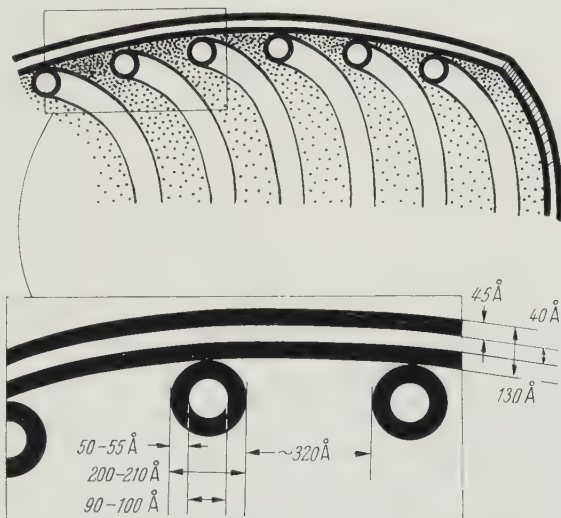


Abb. 3. Schema des Periplasten der begeißelten Formen von *Trypanosoma Cruzi* und der *Leishmania*-form. Der Periplast besteht aus einer 130 Å dicken dreigeschichteten Membran und den unmittelbar daruntergelegenen Fibrillen. Jede der beiden osmiophilen Membranschichten des Periplasten ist 45 Å dick, die osmiophobe Mittelschicht 40 Å. Die Fibrillen (200 bis 210 Å im Durchmesser) liegen als wandverstärkende Röhren unmittelbar an der Innenfläche der Hüllmembran. Der helle Innenraum der Fibrillen mißt 90—100 Å, der seitliche Abstand der Fibrillen etwa 320 Å.

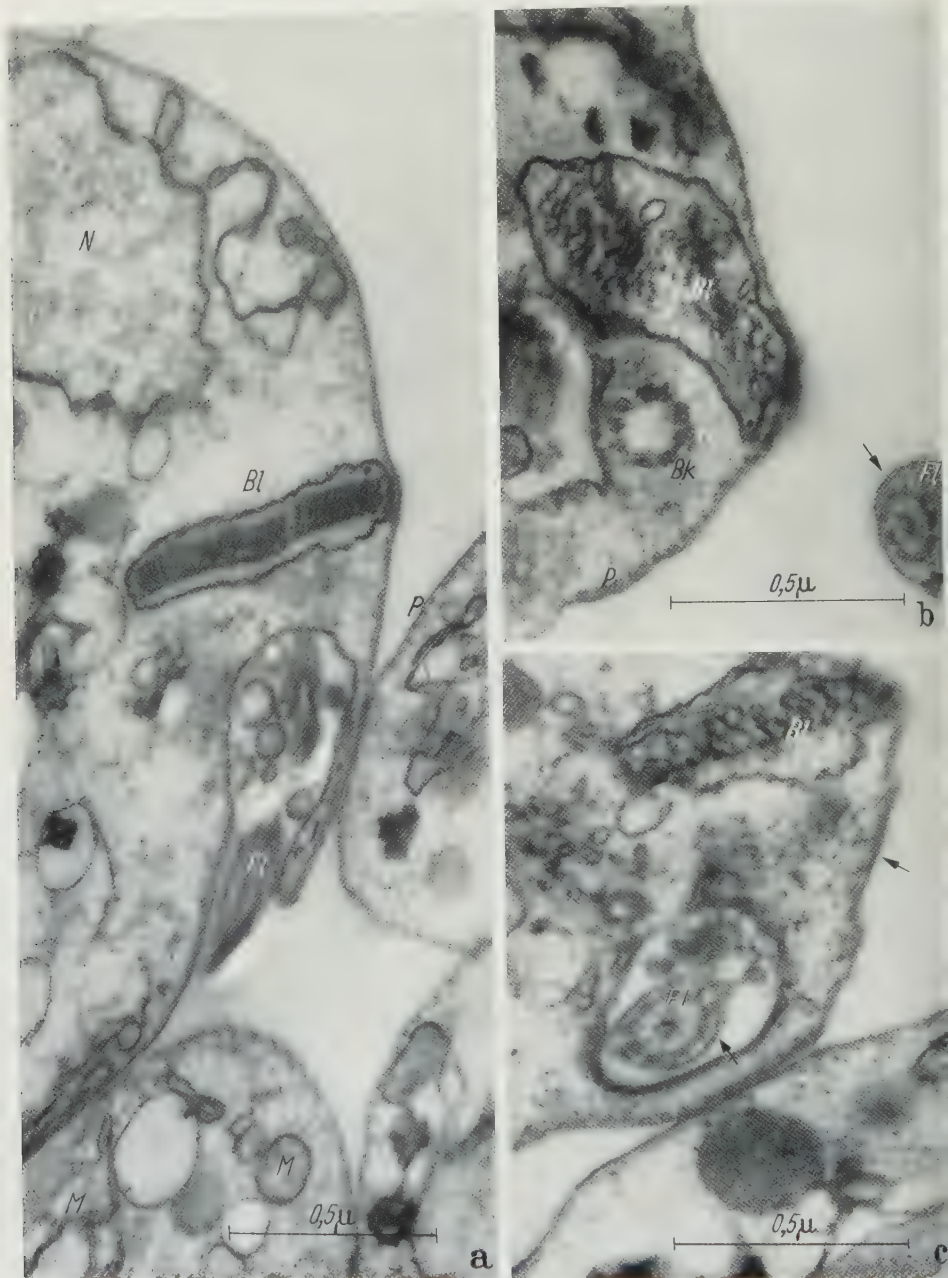
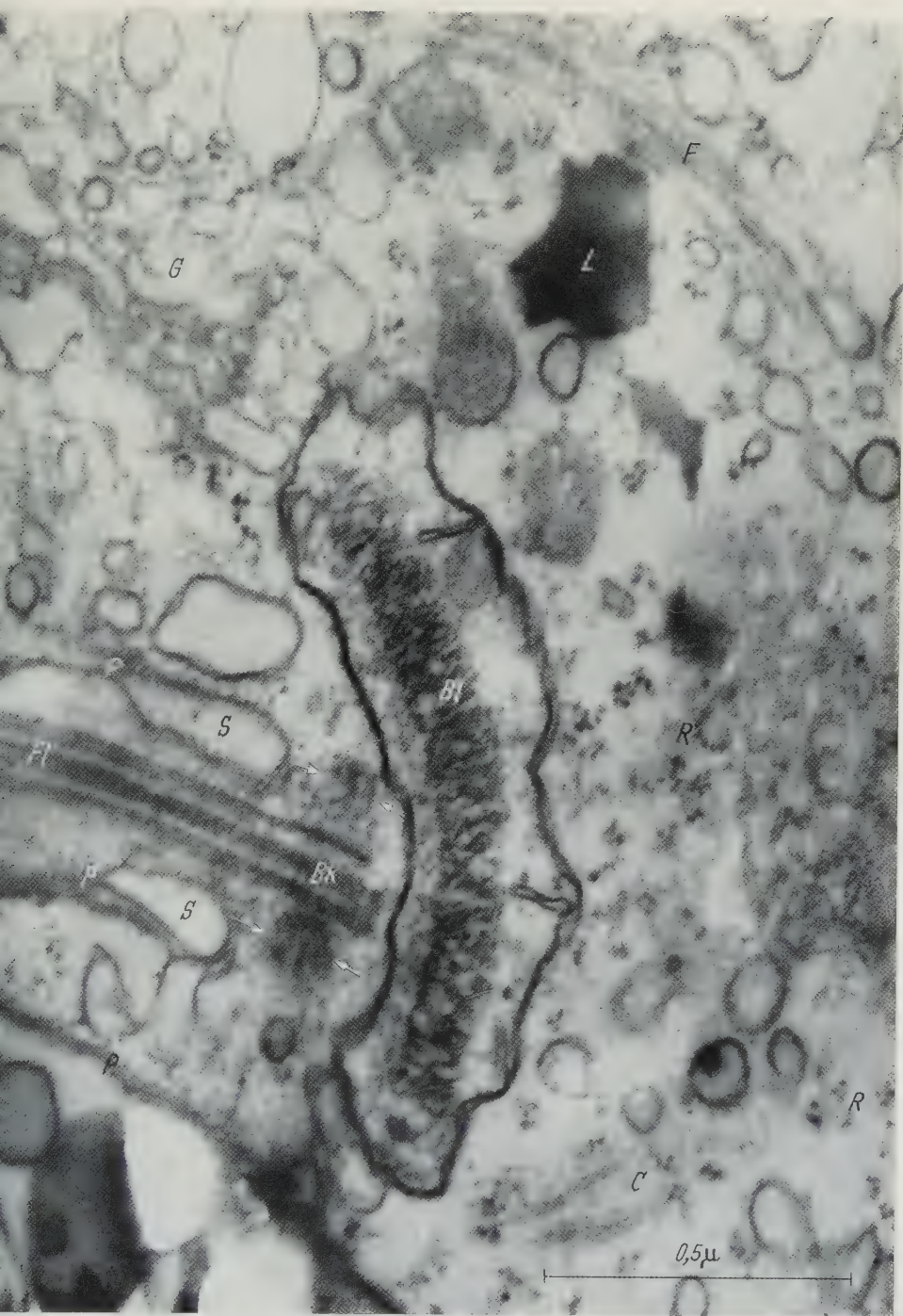


Abb. 4a—c. *Trypanosoma Cruzi* aus der Agar-Kultur. In Abb. 4a das seitlich aus der Zelle austretende Flagellum (Fl) schräggesechnitten, in Abb. 4b und c quergesechnitten. Im Flagellum neun peripher gelegene und zwei zentral gelegene Filamente. Jedes Filament setzt sich aus zwei Subfilamenten zusammen. Die peripheren Filamente reichen bis in das Basalkörperchen (BK) hinein, die zentralen Filamente nicht (vgl. Abb. 4b). Bei den Pfeilen (→) die doppelkonturierten Membranen des Periplasten (P) die auch in der Hülle des Flagellum nachweisbar sind. Bl quer und etwas schräg zur Längsachse geschnittene Blepharoplasten; N Nukleus; M Mitochondrien. Archiv-Nr.: a) 1213 A/59, b) 1210 B/59, c) 1198 B/59. Elektronenmikroskopische Vergr.: a) 13650:1, b) und c) 16140:1. Abb.: a) 51900:1 b) und c) 61400:1



b. 5. Ausschnitt aus der Geißelbasis von *Trypanosoma Cruzi* der Agar-Kultur. Der große Blepharoplast (BK) quer zur Längsachse geschnitten und zur Geißelbasis hin etwas gekrümmt. Im Blepharoplast spiralförmig angeordnete Fibrillen. Die Hülle des Blepharoplasten besteht aus einer mitochondrienähnlichen Doppelmembran mit einigen Cristae. Bei den Pfeilen ($\rightarrow \leftarrow$) um das Basalkörperchen angeordnete perikorpuskuläre Satelliten („Tochterkörperchen“). Die Tochterkörperchen mit ihren Filamenten sind quer zur Längsachse des Basalkörperchens angeordnet. *Fl* längsgeschnittene periphere Filamente des Geißellumens, die an der Seite des Parasiten aus der Zelle heraustreten. Der Periplast (*P*) an der Geißelbasis ist dilatiert und etwas dilatiert. Durch die Dilatation entsteht an der Geißelmündung ein ringförmiger Schlauch (*S*). *F* intrazytoplasmatische Filamente für ein neues Flagellum. *C* Centriol; *R* vorwiegend mit Golgi-Membranen und Golgi-Vakuolen; *L* Fetttropfen. Archiv-Nr.: 1213 E/59.

Elektronenmikroskopische Vergr.: 16140:1. Abb.: 83200:1

dreidimensionale Struktur und die Membrandicken von Hüllmembran und Fibrillen des Blepharoplasten sind in den Abb. 9 und 10 wiedergegeben. Blepharoplasten, die offenbar kurz vor der Teilung stehen (Abb. 6), haben einen großen Längsdurchmesser und sind annähernd schwalbenförmig. Die zu erwartende Teilungsstelle liegt quer zur Längsachse in der Mitte des Blepharoplasten.



Abb. 6. Ausschnitt aus der Geißelbasis von *Trypanosoma Cruzi* der Agar-Kultur. Zwei Basalkörperchen (BK) mit den dazugehörigen Geißeln (Fl). Bei den Pfeilen (↓) erkennt man in den Geißeln zwischen den Basalkörperchen und den distal gelegenen Filamenten durch eine Membran begrenzte Kammern. Im rechten Flagellum an der distalen Seite der Kammer offenbar ein zentrales Filament, nieten- oder schraubenförmig mit der Kammerwand befestigt. Der große Blepharoplast (Bl) steht vor der Teilung. Er ist quer zur Längsachse geschnitten und etwa schwalbenförmig. Die zu erwartende Teilungsstelle genau in der Mitte des Blepharoplasten. P Periplast mit dilatierten Invaginationen (S). Im Zytoplasma außerdem ein Fetttropfen, ein Mitochondrion und Ribosomen. Archiv-Nr.: 1970 C/61. Elektronenmikroskopische Vergr.: 14 800:1. Abb.: 57 700:1

An der zur Geißelbasis gerichteten Oberfläche des Blepharoplasten finden sich in sehr vielen Blepharoplasten knospenförmige, meist länglich ausgezogene mitochondrienähnliche Fortsätze; letztere stellen möglicherweise nach der Abschnürung vom Blepharoplasten Mitochondrien dar. Meist entstehen die Fortsätze an einem Ende der Längsachse des Blepharoplasten (Abb. 8a), sie können aber auch wie der Zelleib von Glockentierchen breitbasig an der zur Geißelbasis gerichteten Oberfläche des Blepharoplasten entstehen (Abb. 7b). Auf Abb. 11 findet sich ein größerer, mitochondrienähnlicher Fortsatz mit stark ineinander verzahnten Innenmembranen. Die Hüllmembran des Blepharoplasten ist kontinuierlich

mit der Außenmembran des mitochondrienähnlichen Gebildes verbunden. Manchmal hat man den Eindruck, daß die Innenmembranen des mitochondrienähnlichen Gebildes von der Hüllmembran des Blepharoplasten gebildet werden. Die beiden Pfeile (↔) auf Abb. 11 links zeigen außerdem auf eine Doppelmembran, die den Fibrillen des Blepharoplasten flach anliegt. Man könnte sich vorstellen, daß diese Doppelmembran bereits ein neues Stück der Blepharoplastenhülle ist, das den Defekt bei der Abschnürung des umfangreichen mitochondrienähnlichen Fortsatzes deckt. Selten ist in den Blepharoplasten auch die Hüllmembran mit den Fibrillen kontinuierlich verbunden (vgl. Abb. 7d).

Die Mitochondrien von *Trypanosoma Cruzi* sind meist sehr schmal und lang und enthalten wenige, regellos angeordnete Innenmembranen. Hin und wieder

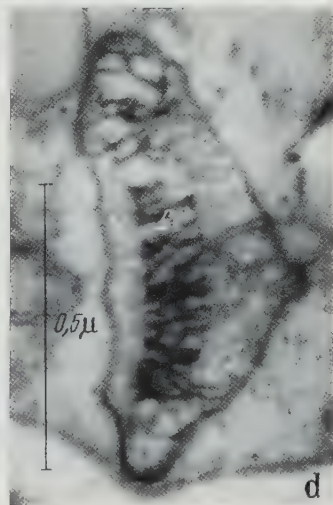
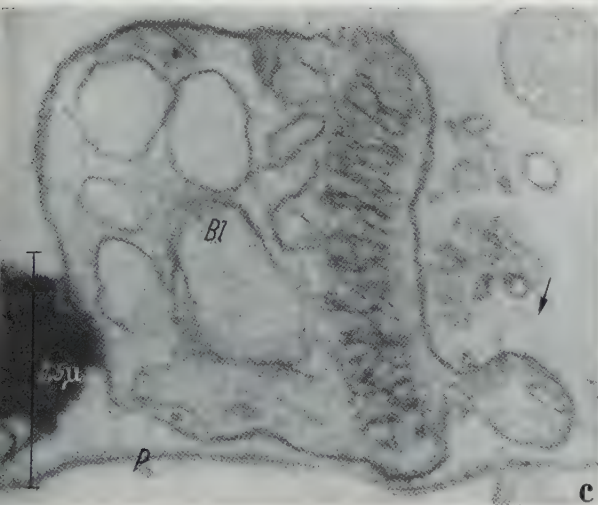
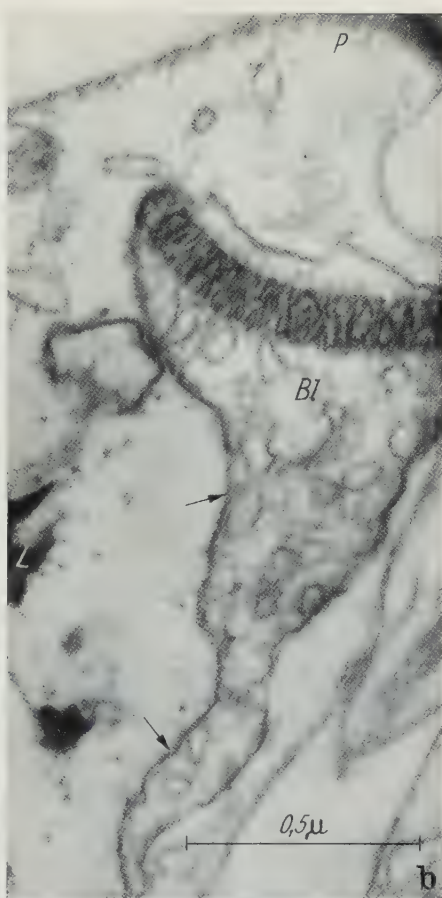
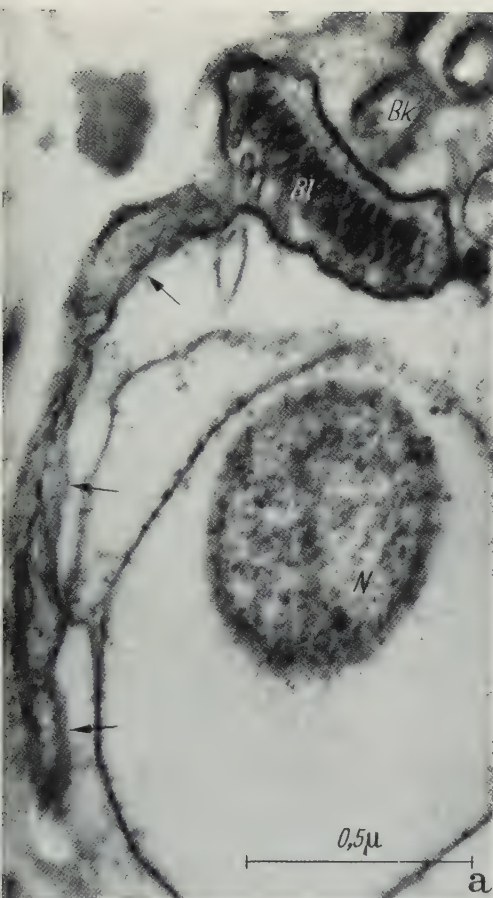


Abb. 7a—d. *Trypanosoma Cruzi* aus der Agar-Kultur. Aus vier verschiedenen Parasiten ist der quer zur Längsachse geschnittene Blepharoplast (Bl) mit seinen spiralig angeordneten Fibrillen wiedergegeben (vgl. Abb. 9). Bei den Pfeilen (→) lang ausgezogene oder knospenförmige mitochondrienähnliche Fortsätze mit zahlreichen Innenmembranen. Auf Abb. 7d erkennt man an einigen Stellen den kontinuierlichen Zusammenhang der mitochondrienähnlichen Innenmembranen mit den Fibrillen des Blepharoplasten. P Periplast mit schräggeschnittenen Fibrillen auf Abb. 7b oben und doppelt-konturierter Membran auf Abb. 7c unten; L Fetttropfen; N Nukleus; BK Basalkörperchen. Archiv-Nr.: a) 1212 E/59, b) 1965 E/61, c) 1964 A/61, d) 1211 A/59. Elektronenmikroskopische Vergr.: a) 16140:1, b) 14800:1, c) 14800:1, d) 16140:1. Abb.: a) 58000:1, b) 59200:1, c) 59200:1, d) 74200:1

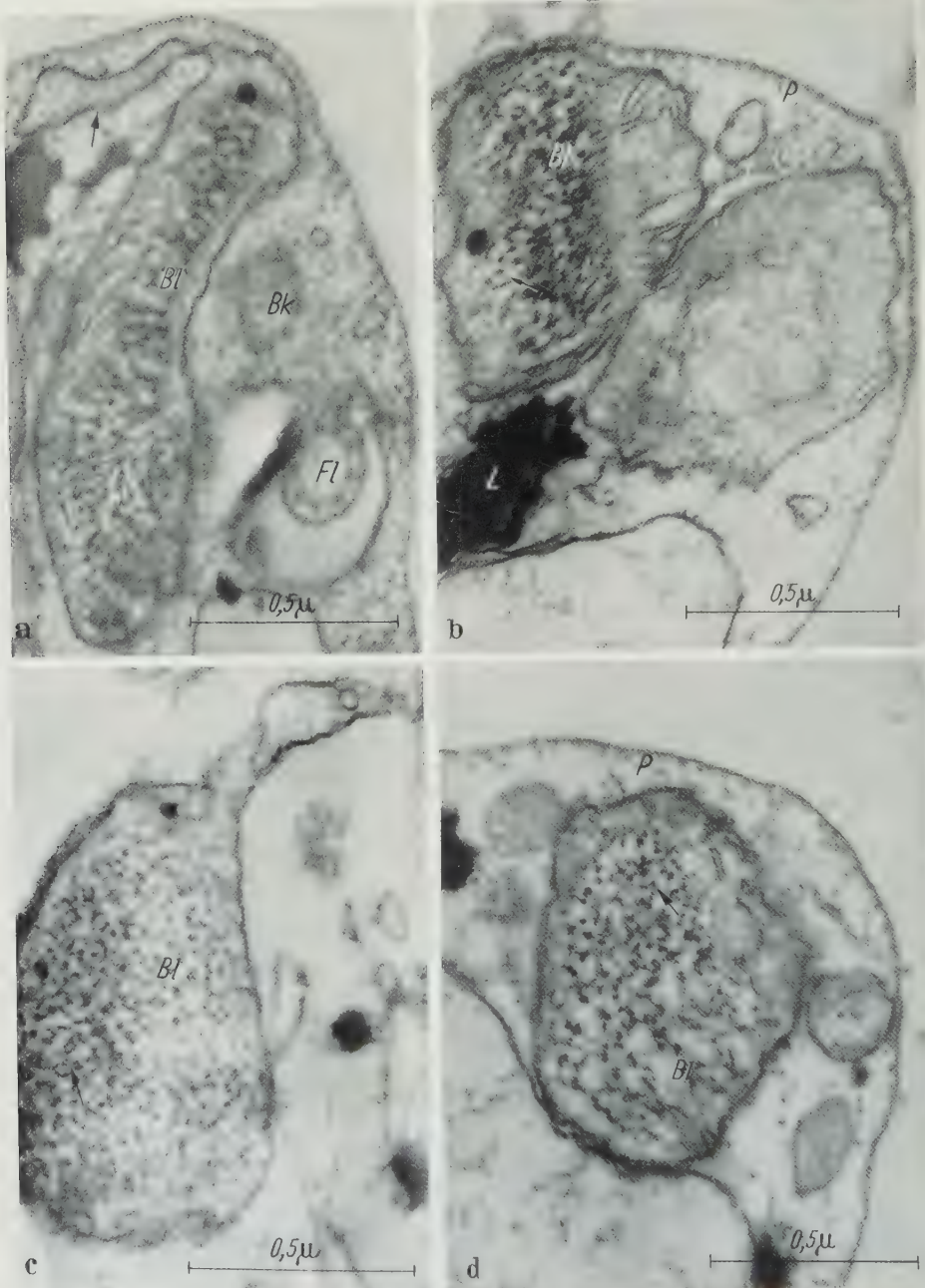


Abb. 8a—d. *Trypanosoma Cruzi* aus der Agar-Kultur. Aus vier verschiedenen Parasiten ist der parallel zur Längsachse geschnittene rund-ovale Blepharoplast (Bl) wiedergegeben (vgl. Abb. 9); auf Abb. 8a liegt der Blepharoplast im oberen Drittel der Abbildung außerdem quer im Schnitt. Im Blepharoplast (→) quergeschnittene Fibrillen. Quergeschnittene Fibrillen zeigen einen osmiophilen Rand und eine helle Innenzone. Der Pfeil (↑) auf Abb. 8a oben links zeigt einen mitochondrienähnlichen Fortsatz des Blepharoplasten. BK Basalkörperchen; Fl Flagellum; L Fetttropfen; P Periplast mit Fibrillen. Archiv-Nr.: a) 1949 C/61, b) 1960 C/61, c) 1210 D/59, d) 1947 E/61. Elektronenmikroskopische Vergr.: a), b) und d) 14800:1, c) 16140:1. Abb.: a), b) und d) 59200:1, c) 64500:1

kommen sehr große Mitochondrien mit unregelmäßig gebauter Oberfläche vor. In ihnen finden sich stark ineinander verzahnte Innenmembranen vom „Zick-

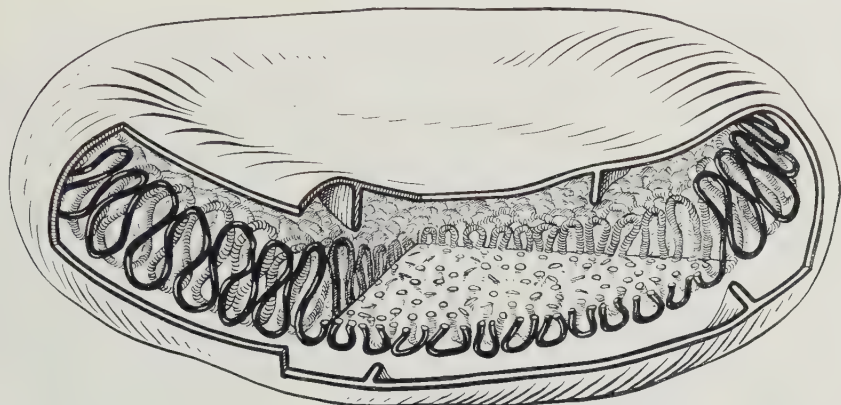


Abb. 9. Dreidimensionales Schema des Blepharoplasten in *Trypanosoma Cruzi*. Der Blepharoplast ist ein zur Geißelbasis hin gekrümmter scheibenförmiger Körper mit einem Längsdurchmesser von $0,75-1,35 \mu$ und einem Querdurchmesser von $0,2-0,3 \mu$. Die größte Länge gilt für Teilungsformen. Im Innern des Blepharoplasten spiralförmig angeordnete 125 \AA dicke Fibrillen, die eine helle Innenzone (Durchmesser 35 \AA) aufweisen. Die Höhe der Fibrillen beträgt $0,12-0,13 \mu$. Die Hülle des Blepharoplasten besteht aus einer mitochondrienähnlichen Doppelmembran; an einigen Stellen Cristae. Die mitochondrienähnlichen Fortsätze des Blepharoplasten, die sich fast immer an der zur Geißelbasis gerichteten Oberfläche des Blepharoplasten finden, sind weggelassen. Die Maße der Membrandicken sind in Abb. 10 angegeben

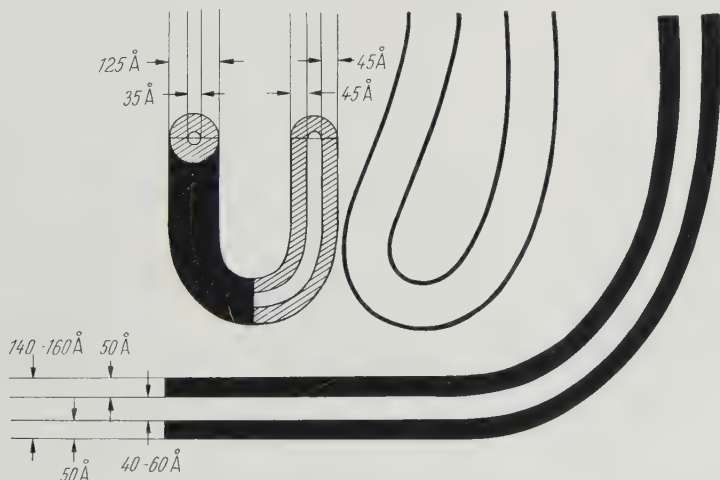


Abb. 10. Schema der Membrandicken von Hüllmembran und Fibrillen des Blepharoplasten in *Trypanosoma Cruzi*. Die spiralförmig angeordneten Fibrillen (vgl. Abb. 9) sind 125 \AA dick. Die osmiophile Membran der Fibrillen mißt 45 \AA , die rohrförmige helle Innenzone 35 \AA . Die mitochondrienähnliche Außenmembran des Blepharoplasten ist $140-160 \text{ \AA}$ dick. Ihre beiden osmiophilen Membranschichten sind je 50 \AA , die helle Mittelschicht $40-60 \text{ \AA}$ dick. Der Abstand zwischen der Hüllmembran des Blepharoplasten und den spiralförmig angeordneten Fibrillen ist aus zeichnerischen Gründen verkürzt

Zack- oder „Ellenbogen“-Typ, wie sie von PAPPAS und BRANDT (1959) für Mitochondrien der Riesenamöbe *Pelomyxa Carolinensis* beschrieben wurden. Auf Abb. 12 ist die eigentümliche Anordnung der Innenmembran besonders bei den Pfeilen ($\uparrow\uparrow\uparrow$) ersichtlich.

Der gut entwickelte *Golgi-Apparat* besteht im wesentlichen aus agranulären Membranen und etwas geschwollenen, dilatierten Golgi-Bläschen. Er liegt meist mit den Centriolen in Nähe des Blepharoplasten (Abb. 5). Außerdem kommen im Zytoplasma der begeißelten Parasiten zahlreiche Fetttropfen, Rosetten von



Abb. 11. *Trypanosoma Cruzi* aus der Agar-Kultur. Der Blepharoplast (*Bl*) bildet an der zum Basalkörperchen (*BK*) fortgerichteten Oberfläche ein größeres Mitochondrium (*M*) mit stark ineinander verzahnten Innenmembranen. Bei dem Pfeil (\downarrow) rechts ist die Hüllmembran des Blepharoplasten kontinuierlich mit der Mitochondrienaußenmembran verbunden. Die beiden Pfeile (\nwarrow) links zeigen auf eine Doppelmembran, die den Fibrillen des Blepharoplasten flach anliegt. *P* Periplast; *L* Fetttropfen. Archiv-Nr.: 1964 B/61. Elektronenmikroskopische Vergr.: 14800:1. Abb.: 59200:

Ribosomen, die meist nicht an Membranen des Ergastoplasmas gebunden sind sowie geschichtete, langgestreckte Membran- oder Lamellensysteme vor (Abb. 13).

b) *Trypanosoma Cruzi* im Herzmuskel der Maus bei experimenteller Chagas-Myokarditis. Bevorzugter Sitz der Parasiten in infizierten Mäusen sind das Interstitium des Herzmuskels und die Herzmuskelzellen. Durch wiederholte Zerteilung entstehen größere Ansammlungen von Parasiten, die zu einer zystenartigen Ausweitung des Interstitiums und vereinzelt auch der Herzmuskelzellen führen; sie werden als „parasitäre Pseudozysten“ bezeichnet. Bei Anwendung der

Ölimmersion erkennt man in diesen Pseudozysten die Parasiten vorwiegend in der rundlichen Leishmaniaform (Abb. 14). Im Zytoplasma der Parasiten liegen neben

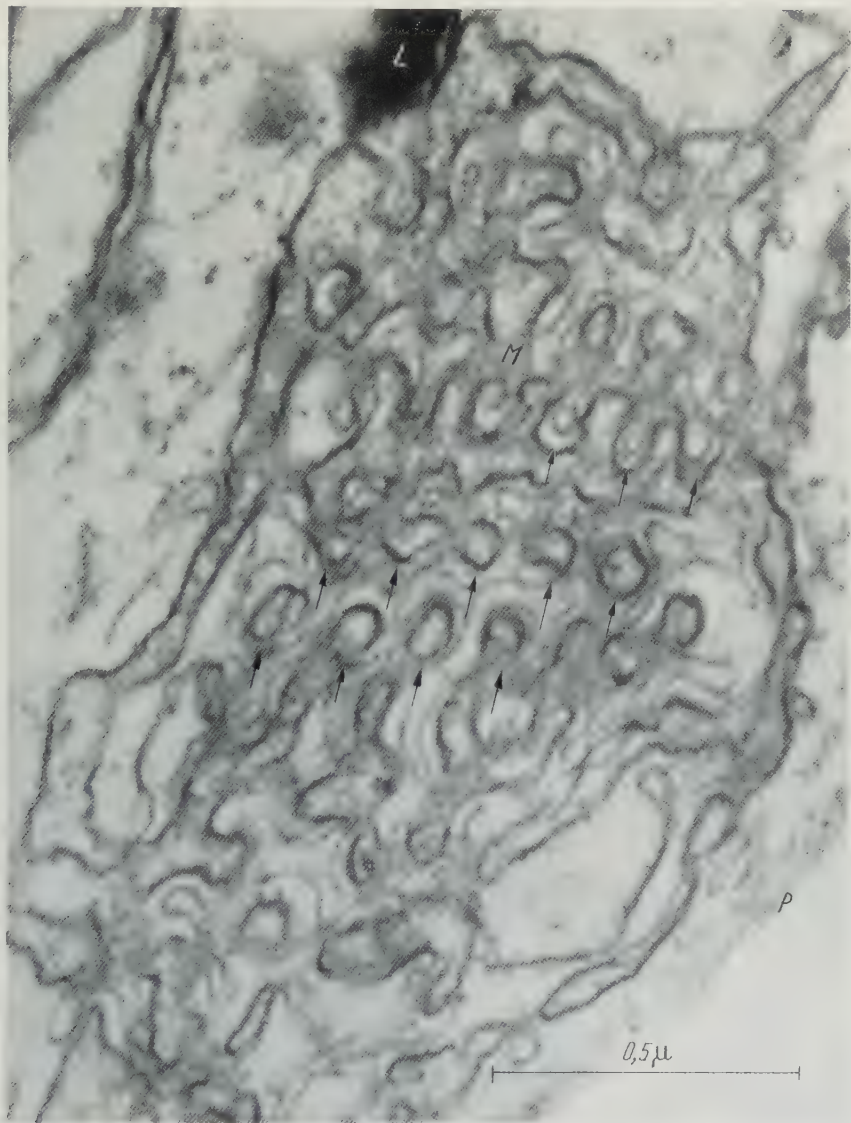


Abb. 12. *Trypanosoma Cruzi* aus der Agar-Kultur. Im Zytoplasma ein größeres Mitochondrion (*M*) mit stark ineinanderverzahnten Innenmembranen vom „Zick-Zack“- oder „Ellenbogen“-Typ. Die eigentümliche Anordnung der Innenmembranen ist besonders bei den Pfeilen (↑↑↑) ersichtlich. *L* Fetttropfen; *P* Periplast. Archiv-Nr.: 1960 B/61. Elektronenmikroskopische Vergr.: 20 000:1. Abb.: 80 000:1

den Zellkernen die deutlich sichtbaren, etwas gekrümmten, feulgenpositiven Blepharoplasten. Elektronenmikroskopisch können die Parasiten im Herzmuskel sowohl in der Leishmaniaform als auch in der Crithidia- und Trypanosomaform angetroffen werden.

Die Abb. 15 und 16 zeigen Ausschnitte aus *Makrophagen* im Interstitium des Herzmuskels. In manchen Makrophagen erkennen wir im ultradünnen Schnitt bis zu zehn Parasiten; in Wirklichkeit dürften aber etwa 20—30 Parasiten in

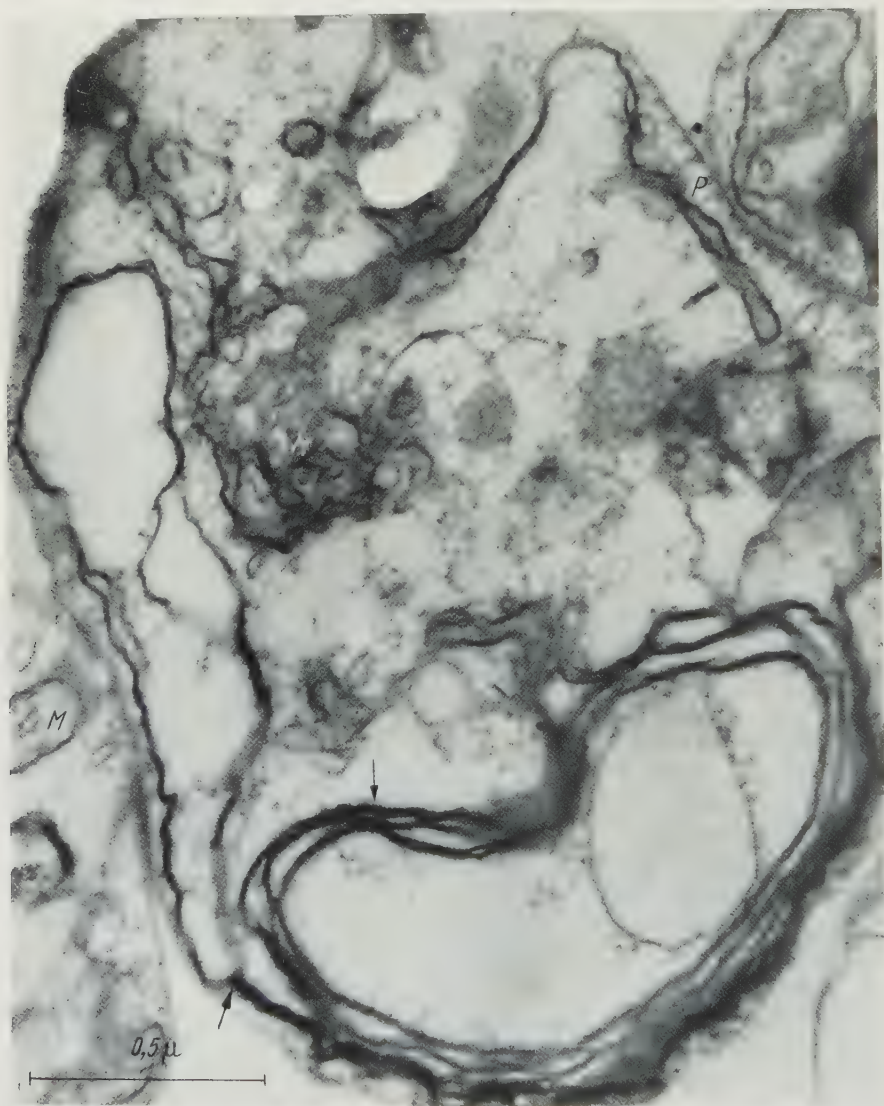


Abb. 13. *Trypanosoma Cruzi* aus der Agar-Kultur. Bei den Pfeilen (\rightarrow) im Zytoplasma zahlreiche, zum Teil geschichtete, zum Teil lang ausgezogene Membransysteme. *M* Anschnitte von Mitochondrien; *P* Perioplast mit quergeschnittenen Fibrillen. Archiv-Nr.: 1212 D/59. Elektronenmikroskopische Vergr.: 16140:1. Abb.: 61400:1

einer Zelle vorkommen. Bei den begeißelten Parasiten liegen die Geißeln im Zytoplasma des Makrophagen (Abb. 15, unten). Morphologisch ist nicht zu entscheiden, ob es sich um Leishmaniaformen handelt, die bereits neue Geißeln gebildet haben, oder ob es in die Makrophagen eingedrungene begeißelte Trypanosomen des Blutes sind. In unseren Präparaten haben wir die meisten Trypanosomen

und Leishmanien in Makrophagen gesehen, wo sie sich offenbar durch Teilung vermehren. Hierfür spricht der Nachweis von doppelt begeißelten Parasiten (Abb. 16).

In den *Herzmuskelzellen* liegen die Parasiten gewöhnlich in der unbegeißelten Leishmaniaform vor. Die Abb. 17 zeigt einen Parasiten in einer Herzmuskelzelle, deren Kern, Myofilamente und Mitochondrien in der Struktur nicht verändert sind. Nur in der unmittelbaren Umgebung des Parasiten ist das Zyto-

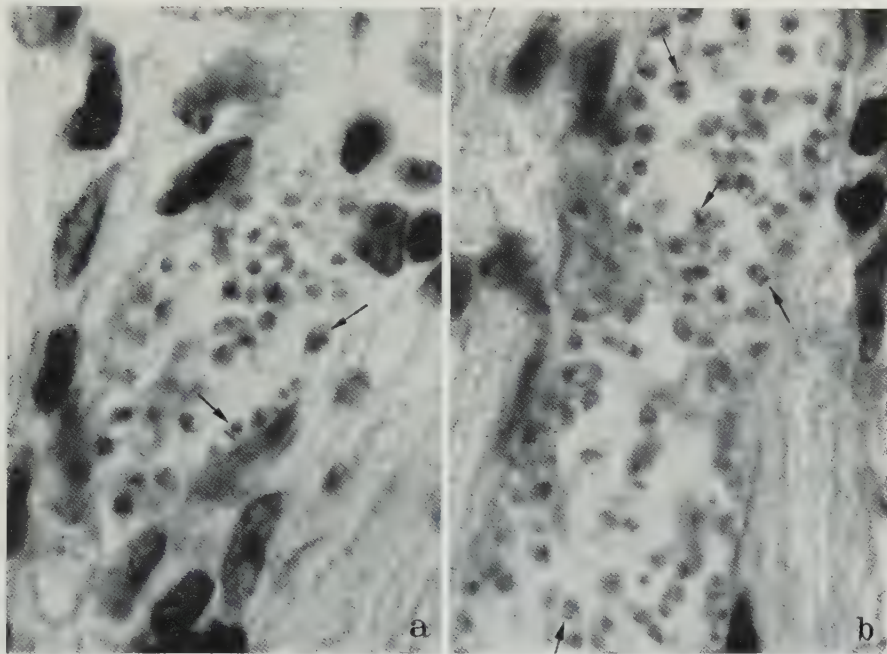


Abb. 14 a u. b. Herzmuskel der *Maus* bei experimenteller Chagas-Myokarditis. Feulgen-Reaktion. Größere parasitäre Pseudozysten im Interstitium der Herzmuskulatur. In den Pseudozysten finden sich *Trypanosoma Cruzi* in der rundlichen Leishmaniaform. Bei den Pfeilen (→) erkennt man in den Parasiten neben dem Zellkern den feulgen-positiven Blepharoplasten. Archiv-Nr.: 06 837--06 839. Lichtoptische Vergr.: 800:1. Abb.: 1500:1

plasma geschwollen. In der Leishmaniaform sind die Parasiten rund bis oval und nur etwa 3—4 μ im Durchmesser groß. An der Innenseite der Hüllmembran des Periplasten finden sich, wie bei den Trypanosomen, die wandverstärkenden Fibrillen, die in regelmäßigen Abständen nebeneinanderliegen. Der Blepharoplast erscheint geschwollen, seine helixartig angeordnete Innenstruktur ist — im Gegensatz zu den Parasiten der Agarformen — etwas vermindert und aufgelockert. Der Blepharoplast der Leishmanien zeigt ebenfalls mitochondrienähnliche Fortsätze. Das Basalkörperchen fehlt; es ist aber von paarigen Centriolen nicht sicher zu unterscheiden (vgl. Abb. 17). Die Zellkerne sind rund und im Gegensatz zu denen der Parasiten in der Agarkultur chromatinreich und dicht. Mitochondrien und Golgi-Apparat sind unauffällig. Im Zytoplasma der Leishmanien finden sich außerdem lange, parallel geschichtete Filamente, wahrscheinlich die Vorstufen der neu zu bildenden Geißeln, doch könnte es sich aber auch um Spindelfasern des Spindelapparates handeln. Diese Filamente kommen auch in Parasiten



Abb. 15. Makrophage aus dem Interstitium des Herzmuskels der *Maus* bei experimenteller Chagas-Myokarditis. Im Makrophagen ein begeißelter Parasit. Das Flagellum (*Fl*) im Zytoplasma des Makrophagen. *Bl* Blepharoplast mit mitochondrienähnlichem Fortsatz (*M*); *Bk* Basalkörperchen; *P* Periplast mit quergeschnittenen Fibrillen; *M* Mitochondrien des Parasiten und des Makrophagen; *G* Golgi-Bläschen(?). Bei dem Pfeil (\rightarrow) ein Cystisom. Im Zytoplasma des Parasiten zahlreiche Ribosomen.

Cm Zellmembran des Makrophagen. Archiv-Nr.: 1253 A/59. Elektronenmikroskopische Vergr.: 16140:1, Abb. 64500:1

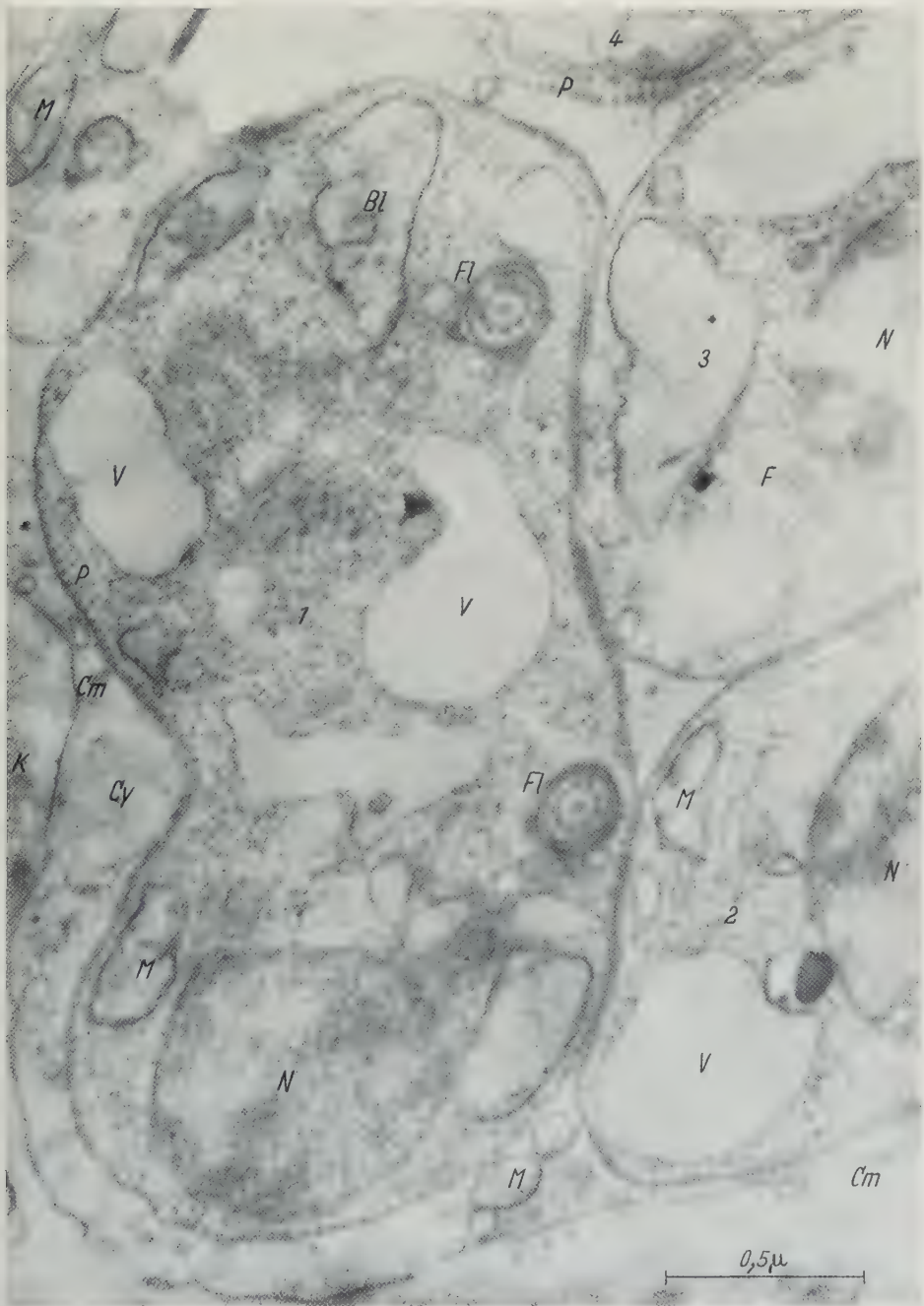


Abb. 16. Ausschnitt aus einem Makrophagen im Interstitium des Herzmuskels der *Maus* bei experimenteller Chagas-Myokarditis. Im Makrophagen Ausschnitte von vier Parasiten (1—4). *P* Periplast mit quergeschnittenen Fibrillen; *N* Zellkerne der Parasiten; *Bl* Blepharoplast; *V* Vakuolen; *Fl* zwei Geißeln eines Parasiten; *F* intrazytoplasmatische Filamente für ein neues Flagellum; *M* Mitochondrien im Zytoplasma der Parasiten und des Makrophagen; *Cy* Zytoplasma des Makrophagen; *Cm* Zellmembran des Makrophagen; *K* kollagene Fibrillen des Interstitiums. Archiv-Nr.: 1241 E/59.

Elektronenmikroskopische Vergr.: 13650:1, Abb.: 52700:1

innerhalb von Makrophagen vor. Das Zytoplasma der Leishmanien zeigt weiterhin viele Ribosomen, die nicht an Membranen des Ergastoplasmas gebunden sind sowie Vakuolen und Cystisomen.



Abb. 17. Experimentelle Chagas-Myokarditis der Maus. *Trypanosoma Cruzi* in der Leishmaniaform (L) in einer Herzmuskelzelle. Bl aufgelockerter Blepharoplast mit mitochondrienähnlichem Fortsatz (M). F Filamente (\hookrightarrow) für ein neues Flagellum. Bei den Pfeilen rechts ($\downarrow \leftarrow$) zwei Centriolen oder Basalkörperchen. P Periplast des Parasiten mit schräggeschnittenen Fibrillen. In der Umgebung des Parasiten ist das Zytoplasma der Herzmuskelzelle geschwollen. N Kern der Herzmuskelzelle; Nm primäre und sekundäre Kernmembran; Myf Myofilamente; M normale Mitochondrien der Herzmuskelzelle.

Archiv-Nr.: 1240 B/59. Elektronenmikroskopische Vergr.: 8250:1, Abb.: 31300:1

2. Histochemische Befunde

Trypanosomen in getrockneten Blutaussstrichen und im Herzmuskelgewebe der infizierten Maus weisen einen stark feulgen-positiven Blepharoplasten auf. In der Giemsa-Färbung treten der Zellkern und der Blepharoplast stark hervor, in der Hämatoxylin-Eosinfärbung ist der Blepharoplast stark basophil und stärker basophil als der Zellkern. Die PAS-Reaktion ist negativ, jedoch nach Behandlung der Parasiten mit Speichelenzymen schwach positiv mit einigen roten Körnchen im Zytoplasma. Der Blepharoplast ist nach der PAS-Reaktion blau gefärbt. Toluidinblau zeigt in Parasiten des Herzmuskels eine deutlich positive orthochromatische Basophilie der Granula im Zytoplasma, die Parasiten der Blutaussstriche sind dagegen nach Einwirken von Toluidinblau diffus blau gefärbt. Die Färbung mit Sudan-Schwarz-B ist nur schwach positiv; sie ergibt eine geringgradige diffuse Braunfärbung des Parasiten.

Diskussion

Die verschiedenen Erscheinungsformen von *Trypanosoma Cruzi* haben den Aufbau einer Zelle, die von einer komplex gebauten Membran umgeben ist. Diese Zellmembran, auch Periplast genannt, besteht nach unseren Untersuchungen aus einer dreigeschichteten, 130 Å dicken Membran und den unmittelbar darunter gelegenen 200—210 Å dicken Fibrillen. Die Fibrillen liegen als wandverstärkende Röhren an der Innenfläche der Hüllmembran. Sie sind selbständige Bauelemente des Periplasten; wegen der engen topographischen Lage zur Zellwand bilden sie aber gemeinsam mit der dreigeschichteten Hüllmembran das architektonische Wandgerüst der Trypanosomen. Diese Wandstruktur findet sich auch in den Leishmanien, die wir in den Herzmuskelzellen bei der experimentellen Chagas-Myokarditis der Maus beobachten konnten. Die dreifach geschichtete Zellmembran der Parasiten ist etwa um 50—70 Å dicker als die Zellmembran von Zellen höher stehender Tiere und des Menschen. Die Schichtung der Zellmembran weist auf die Existenz geschichteter Lipoprotein-Systeme hin. Der Aufbau der Zellmembran aus zwei osmiophilen und einer osmiophoben Mittelschicht konnte in annähernd gleichen Membrandicken auch von WOHLFARTH-BOTTERMANN (1959, 1960) in der Zellwand von *Amoeba proteus* und *Hyalodiscus simplex* nachgewiesen werden.

Die fibrillären Strukturen der Trypanosomenwand lassen sich elektronenmikroskopisch eindrucksvoll auch in aufgetropften und bedampften Parasiten nachweisen. KLEINSCHMIDT (1950/51), KLEINSCHMIDT und KINDER (1950/51) sowie KLEINSCHMIDT und SCHLEICH (1951/52) fanden an der Oberfläche von *Trypanosoma lewisi* und *Trypanosoma brucei*, die mit Osmiumsäure fixiert und anschließend mit Titandioxyd bedampft waren, zahlreiche, etwa 60 µ dicke Fibrillen, die sich über den ganzen Zelleib ausdehnen. SCANGA (1959) beobachtete diese Fibrillen an Auftropfpräparaten von *Trypanosoma brucei* und besonders gut an *Trypanosoma evansi*. CHANG (1956) sah bei *Leishmania donovani* eine doppelte Zellmembran, deren äußere glatt und deren innere gestreift ist. Auch PYNE (1958) sowie CHAKRABORTY und DAS GUPTA (1958) finden bei *Leishmania donovani* eine „innere fibrilläre“ und eine „äußere glatte“ Zellmembran. Die nochmalige Unterteilung der „äußeren glatten“ Zellmembran in drei Schichten konnten sie jedoch nicht nachweisen. MEYER und PORTER (1953) wiesen die Fibrillen auch in

aufgetropften Blutagar-Formen von *Trypanosoma Cruzi* nach; die Autoren bezeichnen sie als „sub-pellicle fibres or striations“. Nach Behandlung mit Trypsin sollen die Fibrillen schwinden, die Fixierbarkeit mit Osmiumsäure lasse eine Proteinzusammensetzung der Fibrillen vermuten. MEYER und PORTER (1953) nehmen an, daß die Fibrillen kontraktile Fähigkeiten besitzen. In einer weiteren elektronenmikroskopischen Arbeit an *Trypanosoma Cruzi*, die mit der Dünnschnittmethode vorgenommen wurde, sind die Fibrillen des Periplasten nicht erwähnt (MEYER, DE OLIVEIRA MUSACCHIO und DE ANDRADE MENDONÇA 1958). Dagegen wurde die röhrenartige Struktur der Fibrillen in der Wand von *Trypanosoma mega* (STEINERT und NOVIKOFF 1960), im Axostyl von *Pyrrsonympha vertens* (GRASSÉ 1956) und in der Wand der Farn-Spermatoiden von *Pteridium aquilinum* (MANTON 1959) festgestellt. Der letztere Befund weist darauf hin, daß Strukturen bestimmter Pflanzenzellen auch im Tierreich vorkommen können.

Besondere Beachtung schenkten wir der Ultrastruktur des Blepharoplasten. Der Blepharoplast stellt einen etwas gekrümmten, scheibenförmigen Körper mit einem Längsdurchmesser von $0,75\text{--}1,35\mu$ und einem Querdurchmesser von $0,2\text{--}0,3\mu$ dar. In der Literatur wird der Blepharoplast meist als ein „stäbchenförmiges“ Gebilde (HARTMANN 1915) bezeichnet, weil er in lichtoptischen Präparaten ein solches Bild zeigt. Der Blepharoplast ist aber in Wirklichkeit ein scheibenförmiges Gebilde, weil wir in unseren elektronenmikroskopischen Aufnahmen niemals kleine runde Querschnitte sahen, die bei einem stäbchenförmigen Gebilde immer wieder in den Schnitten auftreten müßten. Der Blepharoplast sowohl der *Trypanosoma*- als auch der *Crithidia*- und der *Leptomonas*-form liegt gemeinsam mit dem Basalkörperchen an der Geißelbasis. Zwischen Blepharoplast und Basalkörperchen bestehen aber keine strukturellen Zusammenhänge.

In angelsächsischen Publikationen wird der Blepharoplast auch als Parabasalkörper bezeichnet (RIS 1960), das Basalkörperchen als Blepharoplast (HORNE und NEWTON 1958). Nach PIEKARSKI (1954) besteht jedoch keine Veranlassung, von der üblichen Nomenklatur, wie sie in der deutschen Literatur üblich ist, abzugehen. HARTMANN (1915) hielt den Blepharoplast für einen zweiten Zellkern und stellte daraufhin die Ordnung der *Binucleata* auf, zu der in erster Linie die Trypanosomiden gehören sollten. Er unterschied einen Hauptkern und einen Geißelkern oder lokomotorischen Kern. Diese Auffassung wurde aber von ihm später wieder aufgegeben (HARTMANN 1928). Wegen seiner Lage an der Geißelbasis ist der Blepharoplast zu der Bewegung der Geißel in Beziehung gebracht worden und deswegen auch als *Kinetonucleus* oder *Kinetoplast* bezeichnet worden. Die Geißel wird jedoch auch bei Verlust des Blepharoplasten in ihrer Bewegungsfähigkeit nicht beeinträchtigt. Nach PIEKARSKI (1954) ist es möglich, daß bei Ausfall des Blepharoplasten der Zellkern dessen Funktion übernehmen kann. PIEKARSKI (1954) weist darauf hin, daß der Blepharoplast durch verschiedene Mitosegifte z. B. das Colchizin, verlorengehen kann. Die alte Auffassung HARTMANNs von der Kernnatur des Blepharoplasten könnte dadurch neuen Boden gewinnen. Es gilt als sicher, daß der Blepharoplast nach Verlust nicht neu gebildet werden kann, weil ein von PIEKARSKI (1954) über 4 Jahre in Meerschweinchen und Mäusen gehaltener Stamm von *Trypanosoma brucei* blepharoplastlos geblieben ist.

Im Innern des Blepharoplasten fanden wir helixförmig angeordnete, 125 \AA dicke Fibrillen. Die osmiophile Wand der Fibrillen ist 45 \AA , ihre rohrförmige helle Innenzone 35 \AA im Querdurchmesser dick. In vergleichenden histochemischen Untersuchungen stellten wir fest, daß der Blepharoplast eine stark positive Feulgen-Nuklealreaktion gibt. Auch von anderen Autoren wurde die positive Feulgen-Reaktion für den Blepharoplasten der Trypanosomen bereits nachgewiesen (BRESSLAU und SCREMIN 1924; G. STEINERT, FIRKET und M. STEINERT

1958; RIS 1960). Die Desoxyribonukleinsäure des Blepharoplasten ist durch Desoxyribonuklease und durch Einbau von H^3 -Thymidin zu entfernen (RIS 1960). Nach WESTPHAL (1960) ist es möglich, daß in den Blepharoplasten der Trypanosomen auch bestimmte Ribonukleinsäuren vorkommen, die mit Azur-eosin Reflektoren bilden. Wir nehmen an, daß die Desoxyribonukleinsäure des Blepharoplasten an die helixförmig angeordneten Fibrillen gebunden ist. In den Fibrillen dürften aber auch Phospho-Lipoproteine mit ungesättigten Fettsäuren vorkommen, da sie eine ausgeprägte Osmiophilie aufweisen. Die Fibrillen unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich von Chromatin der Zellkerne der Trypanosomen; der Grad ihrer Osmiophilie ist aber der gleiche wie jener der Nukleoli.

Die Fibrillen im Blepharoplasten wurden bereits in *Trypanosoma Cruzi* (MEYER, DE OLIVEIRA MUSACCHIO und DE ANDRADE MENDONÇA 1958), in *Trypanosoma lewisi* (RIS 1960), in *Trypanosoma mega* (STEINERT 1960), in *Strigomonas oncopelti* (HORNE und NEWTON 1958, NEWTON 1958) und in *Leishmania donovani* (DE PAOLA und DA SILVA 1960) gesehen. In der vorliegenden Arbeit versuchten wir, die verschiedenen Schnittbilder der Blepharoplasten genau zu analysieren und in einem dreidimensionalen Schema wiederzugeben. Unsere Befunde geben, besonders was die Anordnung, Struktur und die Maße der Fibrillen des Blepharoplasten betrifft, den gegenwärtigen Stand der Untersuchungen wieder, so daß das Schema später korrigiert oder ergänzt werden kann. Obwohl wir eine optimale Auflösung in unserem Elektronenmikroskop hatten und besonders dünne Schnitte anfertigten, ist es uns nicht möglich gewesen, festzustellen, ob die Fibrillen des Blepharoplasten etwa kontinuierlich oder aus mehreren Stücken zusammengesetzt sind. In dieser Frage wird man erst nach Anwendung verschiedener Fixierungs- und Einbettungsverfahren, Klarheit erlangen können (Artefakte?). Zu erwähnen ist, daß auch in den Enden der Spermatiden von Lebermoosen an der Geißelbasis ein vakuolenreicher Körper vorkommt. HEITZ (1959, 1960), der ihn als Blepharoplast gedeutet hat, wies auf die Möglichkeit einer Homologie mit einem Chondriosom hin. Unmittelbar neben diesen Blepharoplasten liegen in den Spermatiden der Lebermoose auch eigenartige „Dreiergruppen“ (HEITZ 1959), in denen Doppelspiralen vorkommen. Diese außerhalb des Blepharoplasten vorkommenden spiralenförmigen Gebilde sahen wir in *Trypanosoma Cruzi* nicht.

Die Hülle des Blepharoplasten besteht aus einer mitochondrienähnlichen, 140—160 Å dicken Doppelmembran, die an einigen Stellen auch Einstülpungen aufweist. Diese Einstülpungen können mit typischen Cristae mitochondriales verglichen werden. Auch die Membrandicke der Blepharoplastenhülle stimmt mit den bisher gemessenen Membrandicken der Mitochondrien vieler Säugetiere und des Menschen überein. Darüber hinaus sahen wir in vielen elektronenmikroskopischen Aufnahmen an der zur Geißelbasis gerichteten Oberfläche des Blepharoplasten knospenförmige und länglich ausgezogene mitochondrienähnliche Fortsätze, die vielleicht Mitochondrien nach Abschnürung vom Blepharoplasten darstellen. In diesen Fortsätzen finden sich zahlreiche Innenmembranen, die manchmal stark ineinander verzahnt sind. Offenbar werden sie von der Hüllmembran des Blepharoplasten gebildet. Meist entstehen die Fortsätze an einem Ende des Blepharoplasten, sie können sich aber auch breitbasig an der zur

Geißelbasis gerichteten Oberfläche des Blepharoplasten ausbilden. Zwischen dem fibrillären Material des Blepharoplasten und der Matrix der mitochondrienähnlichen Fortsätze befinden sich keine trennenden Membranen; diese treten wahrscheinlich erst kurz vor der Abschnürung auf. Ähnliche strukturelle Beziehungen zwischen Blepharoplasten und Mitochondrien wurden kürzlich auch bei anderen Trypanosomen beobachtet (STEINERT 1960; RIS 1960; CLARK 1960). Vorläufige histochemische Untersuchungen an überlebenden *Trypanosoma lewisi* und *Trypanosoma mega* ergaben darüberhinaus eine positive Janus-Grün B-Reaktion der „kinetonucleus-associated mitochondria“ (STEINERT 1960; RIS 1960). Diese und unsere elektronenmikroskopischen Befunde weisen darauf hin, daß der Blepharoplast als Gegenpol des Zellkerns nicht nur Desoxyribonukleinsäure möglicherweise mit zytoplasmatischen Genen enthält, sondern darüberhinaus auch an der Bildung der Mitochondrien und ihrer Atmungsfermente beteiligt ist. Hierdurch wird die Annahme von REICHENOW (1939, 1940, 1953) bestätigt, daß der Blepharoplast ein Stoffwechselorganell sei. Die produktiven Fähigkeiten des Blepharoplasten erweitern auch in allgemein biologischer Sicht unsere spärlichen Kenntnisse über die Entstehung der Mitochondrien. Die einzigen bisher bekannten strukturellen Beziehungen zwischen Zellkern und Mitochondrien wurden von BRANDT und PAPPAS (1959) in Amöben vom Typ *Pelomyxa carolinensis* WILSON (Chaos chaos L.) beschrieben. Diese Ergebnisse können aber vorerst nicht auf die Entstehung von Mitochondrien höher aufgebauter Tiere und des Menschen bezogen werden, da darüber keine vergleichbaren Befunde vorliegen.

Der Blepharoplast vermag sich weiterhin selbst zu teilen und damit den Zellkern und die Zellteilung zu beeinflussen. Nach den lichtmikroskopischen (HARTMANN 1915) und elektronenmikroskopischen Befunden (MEYER, DE OLIVEIRA MUSACCHIO und DE ANDRADE MENDONÇA 1958) an *Trypanosoma Cruzi* können wir bestätigen, daß sich der Blepharoplast *quer* zur Längsachse teilt. Die Teilung des Blepharoplasten liegt zeitlich vor der Kernteilung. Bevor der „schwalbenförmige“ Blepharoplast sich endgültig teilt, haben sich aber schon die Basalkörperchen geteilt und sog. Tochterkörperchen sowie eine neue Geißel gebildet (Abb. 5 und 6). Bei der Teilung der Parasiten behält also eine Tochterzelle die alte Geißel der Mutterzelle, während die andere Tochterzelle eine neue, im Zytoplasma der Mutterzelle gebildete Geißel erhält. Die Filamente der neu zu bildenden Geißeln konnten wir in den Trypanosomen und in den Leishmanien elektronenmikroskopisch häufig nachweisen (Abb. 5 und 17).

Zusammenfassung

Der *Periplast* der begeißelten Trypanosomen (*Trypanosoma Cruzi*) und der Leishmaniaform besteht aus einer 130 Å dicken, dreigeschichteten Membran und den unmittelbar daruntergelegenen Fibrillen. Jede der beiden osmiophilen Membranschichten des Periplasten ist 45 Å dick; die osmiophobe Mittelschicht mißt 40 Å. Die Fibrillen sind 200—210 Å dick und liegen als wandverstärkende Röhrchen unmittelbar an der Innenfläche der Hüllmembran. Der helle röhrenförmige Innenraum der Fibrillen hat einen Querdurchmesser von 90—100 Å. Der seitliche Abstand der Fibrillen mißt etwa 320 Å.

Der *Blepharoplast* ist ein etwas gekrümmter, scheibenförmiger Körper mit einem Längsdurchmesser von 0,75—1,35 μ und einem Querdurchmesser von

0,2—0,3 μ . Er liegt gemeinsam mit dem Basalkörperchen an der Geißelbasis. Der Blepharoplast gibt eine positive Feulgen-Nuklealreaktion und enthält Desoxyribonukleinsäure. Elektronenmikroskopisch finden sich im Innern des Blepharoplasten helixförmig angeordnete 125 Å dicke Fibrillen, die einen 35 Å im Querdurchmesser messenden helleren Innenraum aufweisen. Die Hülle des Blepharoplasten besteht aus einer mitochondrienähnlichen Doppelmembran, die an einigen Stellen auch Cristae bildet. An der zur Geißelbasis gerichteten Oberfläche des Blepharoplasten kommen knospenförmige und länglich ausgezogene mitochondrienähnliche Fortsätze vor, von denen wir vermuten, daß sie Mitochondrien nach Abschnürung vom Blepharoplasten darstellen. In diesen Fortsätzen finden sich zahlreiche Innenmembranen, die manchmal stark ineinander verzahnt sind. Offenbar werden sie von der Hüllmembran des Blepharoplasten gebildet. Es wird angenommen, daß der Blepharoplast ein mit Desoxyribonukleinsäure und Lipoproteinen, möglicherweise auch mit Atmungsfermenten besonders ausgestattetes Zellorganell ist, das sich zu teilen vermag, den Zellkern und die Zellteilung beeinflußt sowie produktiv an der Bildung der Mitochondrien beteiligt ist.

Die Zellteilung der Parasiten beginnt mit einer Bildung von Tochterkörperchen durch die Basalkörperchen und der Ausbildung einer zweiten Geißel. Die Filamente der zweiten Geißel werden im Zytoplasma der Mutterzelle gebildet. Danach teilt sich der Blepharoplast quer zur Längsachse. Der Blepharoplast ist vor der Teilung etwa 1,35 μ lang und schwalbenförmig. Nach der Querteilung des Blepharoplasten erfolgt erst die Kernteilung und die Längsteilung des Zytoplasmas.

Literatur

- BRANDT, P. W., and G. D. PAPPAS: Mitochondria. II. The nuclear-mitochondrial relationship in *Pelomyxa carolinensis* Wilson (*Chaos chaos* L.). J. biophys. biochem. Cytol. **6**, 91—96 (1959).
- BRESSLAU, E., u. L. SCREMIN: Die Kerne der Trypanosomen und ihr Verhalten zur Nuklealreaktion. Arch. Protistenk. **48**, 509 (1924).
- CHAGAS, C.: Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do schizotrypanum cruzi n.ge., n.sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Osw. Cruz **1**, 159—218 (1909).
- Nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Osw. Cruz **3**, 219 (1911).
- CHAKRABORTY, J., and N. N. DAS GUPTA: Ultrastructure of the pellicle and the nucleus of *Leishmania donovani*. IV. Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, Berlin 1958, Verh.-Bd. II, S. 510—515. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- CHANG, P. C. H.: The ultrastructure of *Leishmania donovani*. J. Parasit. **42**, 126—136 (1956).
- CLARK, W. H.: J. Protozool. **7**, 115 (1960).
- ELKELES, G.: Über die Chagas-Krankheit und das *Trypanosoma cruzi* sowie die anderen amerikanischen Trypanosomeninfektionen. Z. Tropenmed. Parasit. **10**, 268—284 (1959).
- GEIGY, R., u. A. HERBIG: Erreger und Überträger tropischer Krankheiten. Acta trop. (Basel) Suppl. **6** (1955).
- GRASSÉ, P. P.: L'ultrastructure de *Pyrrsonympha vertens* (Zooflagellata Pyrrsonymphina): les flagelles et leur coaptation avec le corps, l'axostyle contractile, le paraxostyle, le cytoplasme. Arch. Biol. (Liege) **67**, 595—611 (1956).
- HARTMANN, M.: Protozoologie, 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1915.
- Praktikum der Protozoologie. 5. erweiterte Aufl. Jena: Gustav Fischer 1928.
- HEITZ, E.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über zwei auffallende Strukturen an der Geißelbasis der Spermatiden von *Marchantia polymorpha*, *Preissia quadrata*, *Sphaerocarpus Donnellii*, *Pellia Fabroniana* (Hepaticae). Z. Naturforsch. **14b**, 399—401 (1959).
- Über die Geißelstruktur sowie die Dreiergruppe in den Spermatiden der Leber- und Laubmoose. European Regional Conference on Electron Microscopy, Delft, 1960.

- HORNE, R. W., and B. A. NEWTON: Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*. II. Fine structure of the kinetoplast-blepharoplast complex. *Exp. Cell. Res.* **15**, 103—111 (1958).
- KLEINSCHMIDT, A.: Über den Feinbau von Trypanosomen. *Z. Tropenmed. Parasit.* **2**, 507—512 (1950/51).
- , u. E. KINDER: Elektronenoptische Befunde an Rattentrypanosomen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **156**, 219—224 (1950/51).
- , u. F. SCHLEICH: Über den Feinbau von Trypanosomen. II. Geißeluntersuchungen. *Z. Tropenmed. Parasit.* **3**, 42—46 (1951/52).
- KÖBERLE, F.: Die Chagas-Krankheit — ihre Pathogenese und ihre Bedeutung als Volksseuche. *Z. Tropenmed. Parasit.* **10**, 236—268 (1959).
- MACCLURE, E., u. R. POCHE: Die experimentelle Chagas-Myocarditis der weißen Maus im elektronenmikroskopischen Bild. *Virchows Arch. path. Anat.* **333**, 405—420 (1960).
- MANTON, I.: Observations on the microanatomy of the spermatozoid of the Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*). *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 413—418 (1959).
- MEYER, H., M. DE OLIVEIRA MUSACCHIO and I. DE ANDRADE MENDONÇA: Electron microscopic study of *Trypanosoma Cruzi* in the sections of infected tissue cultures and of blood-agar forms. *Parasitology* **48**, 1—8 (1958).
- , and K. R. PORTER: A study of *Trypanosoma cruzi* with the electron microscope. *Parasitology* **44**, 16—23 (1953).
- NEWTON, B. A.: Fine structure of the kinetoplast in a trypanosomid flagellate. IV. Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, Berlin 1958, *Verh.-Bd. II*, S. 515—517. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- PALADE, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. *J. exp. Med.* **95**, 285—298 (1952).
- PAOLA, D. DE, and J. R. DA SILVA: Histopathologie der Kala-Azar. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **39**, 1—52 (1960).
- PAPPAS, G. D., and P. W. BRANDT: Mitochondria. I. Fine structure of the complex patterns in the mitochondria of *Pelomyxa carolinensis* Wilson (*Chaos chaos* L.). *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 85—90 (1959).
- PIEKARSKI, G.: Lehrbuch der Parasitologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.
- PYNE, C. K.: Electron microscopic investigations on the leptomonad form of *Leishmania donovani*. *Exp. Cell Res.* **14**, 388—397 (1958).
- REICHENOW, E.: Über die Bedeutung des Blepharoplasten. 3. Internat. Congr. Microbiol., New York, 1939.
- Zur Frage der Bedeutung des Blepharoplasten der Trypanosomen. *Arch. Inst. Biol.* **11**, 433—436 (1940).
- Lehrbuch der Protozoenkunde, 6. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1953.
- RIS, H.: The structure of the kinetoplast in trypanosomes. X. Congr. Internat. de Biologie Cellulaire, Paris 1960, Abstract. S. 232—233.
- RYTER, A., et E. KELLENBERGER: L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomie. *J. ultrastruct. Res.* **2**, 200—214 (1958).
- SCANGA, F.: Atlante di microscopia elettronica. Vol. I, p. 242—244. Roma: Pensiero Scientifico 1959.
- STEINERT, G., H. FIRKET et M. STEINERT: Synthèse d'acide désoxyribonucléique dans le corps parabasal de *Trypanosoma mega*. *Exp. Cell Res.* **15**, 632—635 (1958).
- STEINERT, M.: Mitochondria associated with the kinetoplast of *Trypanosoma mega*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 542—546 (1960).
- , and A. B. NOVIKOFF: The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome, *Trypanosoma mega*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 563—569 (1960).
- WESTPHAL, A.: Reflexmikroskopische Untersuchungen am Kern und Blepharoplast einiger Trypanosomen mit dem Azureosin-Reflektor (Giemsa-Färbung). *Z. Tropenmed. Parasitol.* **11**, 24—35 (1960).
- WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E.: Die elektronenmikroskopische Untersuchung cytoplasmatischer Strukturen. *Verh. Dtsch. Zool. Ges., Münster i. Westf.* 1959, S. 393—419.
- Protistenstudien X. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Amöbe *Hyalodiscus simplex* n.sp. *Protoplasma* **52**, 58—107 (1960).

Privatdozent Dr. H. SCHULZ,

Pathologisches Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf, Moorenstraße 5

Aus der Elektronenmikroskopischen Abteilung des Anatomischen Institutes der Universität
Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. W. BARGMANN)

CHONDROGENESE UND OSTEOGENESE*
ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UND LICHTMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN

Von
KARL-HEINRICH KNESE und ANNE-MARIE KNOOP

Mit 26 Textabbildungen
(Eingegangen am 6. April 1961)

Inhalt	Seite
I. Einleitung	413
II. Material und Methode	414
III. Befunde	415
1. Elektronenmikroskopische Beobachtungen am Perichondrium und Periost	415
2. Die Ordnung der Fibrillen im präossalen Knochengewebe	421
3. Flache Zellen (verdämmernde Zellen)	423
4. Lichtmikroskopische Befunde	437
IV. Diskussion	449
1. Struktur der skeletogenen Zellen	449
2. Die Beziehungen der Zellen zu ihrer Umgebung	455
3. Der Zelluntergang	456
4. Die Fibrillogenese	459
5. Chondrogenese und Osteogenese	461
Zusammenfassung	463
Literatur	465

I. Einleitung

Die Stützgewebe sind aus mehreren Gewebekomponenten aufgebaut, nämlich: Zellen, Fasern, organischer Interfibrillärsubstanz und anorganischen Kristalliten. Jede dieser Gewebekomponenten entsteht durch einen gesonderten Bildungsvorgang. Alle Prozesse zusammen werden dann als Chondrogenese bzw. Osteogenese bezeichnet. Knochen- und Knorpelgewebe unterscheiden sich in ihrer Struktur, in dem unterschiedlichen prozentualen Anteil an verschiedenen Gewebekomponenten; vermutlich weisen letztere auch strukturelle Verschiedenheiten auf. Damit liegt die Frage nahe, welche Differenzen der Bildungsvorgänge in raumzeitlicher Ordnung zur unterschiedlichen Struktur beider Gewebe führen.

Mit der Knorpelbildung soll einmal die Knochenbildung durch polar gestaltete Osteoblasten im Bereich der Diaphyse verglichen werden. Über unsere licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen (KNESE 1956, 1957, KNESE und KNOOP 1958) der periostalen Osteogenese haben wir bereits berichtet. Zusammenfassende Darstellungen über die Histochemie der polar differenzierten Osteoblasten geben FOLLIS und BERTHRONG (1948, 1949), BEVELANDER und JOHNSON (1950), PRITSCHARD (1952, 1956), SOGNAES (1955), MONESI und BETTINI (1958),

* Durchgeführt mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

sowie PUTSCHAR (1960). Wir beschränken uns daher auf jene Befunde, die den unterschiedlichen Ablauf von Knorpel- und Knochenbildung charakterisieren.

Außer den polar differenzierten Osteoblasten sind auch die Zellen am Übergang vom Perichondrium zum Periost zu berücksichtigen. Lichtmikroskopisch unterscheiden sich die hier vorliegenden Knochenbildungszellen von den mehr oder minder polar differenzierten Osteoblasten der Diaphysenmitte durch ihre flache Gestalt und die Bildung eines sog. Osteoblastensynzytiums (PETERSEN 1919). Wir haben vorgeschlagen (KNESE 1956), diese Zellen als Knochenbildner von den polar differenzierten Osteoblasten im engeren Sinne zu unterscheiden; kürzlich hat PRATT (1957) diese Zellen als Präosteoblasten bezeichnet. Bei dieser seit langem bekannten Knochenbildungsform (Literatur bei KNESE 1956) gewinnt man lichtmikroskopisch den Eindruck, daß die Zellen in der Interzellularsubstanz aufgehen, soweit sie nicht als Osteozyten eingeschlossen werden. Dieser Vorgang des Zellschwundes wurde von SCHAFER (1930) als Verdämmern (vgl. Diskussion) bezeichnet. Zur Kennzeichnung des unterschiedlichen Verhaltens der flachen und der polar gebauten Zellen wurde von einer holokrinen oder holoplasmatischen Knochenbildung gegenüber der meroplasmatischen oder apokrinen der polaren Osteoblasten gesprochen (WEIDENREICH 1923, KNESE 1956). Ähnliche Vorgänge des Zellunterganges wurden bei der Knorpelbildung beobachtet (vgl. SCHAFER 1930).

Zur Terminologie: Die Umhüllung eines Skeletstückes wurde bisher als Perichondrium bezeichnet, wenn das Skeletelement aus Knorpel aufgebaut ist; demgemäß beschrieb man die erste Knochenbildung als „perichondrale“ Osteogenese. Erst nach Ablagerung der periostalen Grundsicht (KNESE 1956) wurde diese Hülle Periost benannt. Elektronenmikroskopisch zeigen die Zellen der Skelethülle aber einen unterschiedlichen Bau bei Knorpel- und Knochenbildung, es sind Chondroblasten bzw. Osteoblasten (KNESE und KNOOP 1958, 1959, 1961a). Wir sprechen infolgedessen von einem Perichondrium, wenn Chondroblasten, und von einem Periost, wenn Osteoblasten vorliegen.

Die Bildungsvorgänge untersuchten wir elektronenmikroskopisch an der Tibia von Rattenfeten. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden am Metacarpus von Rinderfeten durchgeführt (vgl. KNESE und KNOOP 1961a, c), und zwar mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens, Beobachtungen im polarisierten Licht und vermittels topochemischer Methoden zum Nachweis von Baustoffen wie Mucopolysacchariden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren.

II. Material und Methode

Elektronenmikroskopisch wurde die Tibia von Rattenfeten von 14,3–32,4 mm SSL untersucht. Fixierung: 1- bzw. 2%ige isotonische und gepufferte (pH 7,2) Osmiumsäurelösung. Färbung: Phosphorwolframsäure. Einbettung: 10 Teile Methacrylsäure-butylester, 1 Teil Methacrylsäure-methylester unter Zusatz von 2% Percadox. Die Schnitte wurden mit dem Porter-Blum-Mikrotom hergestellt. Aufnahmen: Siemens Elmiskop I (Strahlspannung 80 kV).

Topochemische Untersuchungen: Tibia von Rattenfeten und Metacarpus von Rinderfeten. Fixierung: Alkohol 100%, Carnoy, Formol 1:4. Paraffinschnitte. Färbungen (Methoden bei ROMEIS 1948, LIPP 1954, GEDIGK 1956). Nukleinsäuren: Feulgen-Reaktion; Gallocyanin. — Pufferfärbung: Methylenblau. — Reaktionen auf KH bzw. MPS: Glykogenfärbung (BEST); PAS (McMANUS); kolloidale Eisenlösung nach HALE (CASSELMANN 1959), GRAUMANN 1958 und MÜLLER 1955/56. — Metachromasie: Toluidinblau 0,5% in Alkohol 20% bzw. in wäßriger Lösung von verschiedenem pH. — Proteine: Ninhydrinreaktion. — Soweit die

Färbungen es gestatten, Kontrolle mit enzymatischer Hydrolyse (Hyaluronidase, Ribonuklease, Desoxyribonuklease, Diastase, Pepsin). Eindecken: Caedax bzw. Eukitt. — Untersuchungen mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens und im polarisierten Licht an $20\ \mu$ dicken, ungefärbten Schnitten, eingebettet in Glyzerinelatine.

III. Befunde

1. Elektronenmikroskopische Beobachtungen am Perichondrium und Periost

Wir beginnen mit einem Vergleich der Chondroblasten und Osteoblasten sowie ihrer Beziehung zu der Interzellulärsubstanz. Die knorpelnahen *Chondroblasten* weisen eine mehr oder minder langgestreckte Gestalt auf. Ihr Kern ist rundlich bis ovoid. Das Chromatin liegt in einer mäßig dicken Schicht der Kernmembran an, kleinere Brocken sind über das Kernareal verteilt. Der nicht allzu große Nukleolus hat häufig Verbindung mit der Kernmembran. Das Cytoplasma enthält neben verstreut liegenden Granula einige Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Die interzellulären Spalten sind von wechselnder, meist beachtlicher Breite. Im Interzellulärraum liegt ein Filz von Kollagenfibrillen. Eine Ausrichtung der Fibrillen ist nicht erkennbar. Weitere Befunde über den Strukturwandel der Zellen des Perichondriums haben wir kürzlich mitgeteilt (KNESE und KNOOP 1961a).

Das *Periost* am Ende der Diaphysenschale zeichnet sich durch eine dichte Aneinanderlagerung der Zellen innerhalb der Kambiumschicht aus (Abb. 1). Im allgemeinen haben die Zellen unmittelbaren Kontakt miteinander. Die interzellulären Spalten sind demgemäß sehr schmal und enthalten keine oder nur vereinzelt Fibrillen. Die Längsachse der Zellen läuft der Längsachse des Skeletstückes parallel. Der Kern ist im allgemeinen zu der einen Seite der länglichen Zelle hin verschoben. Die Schicht des randständigen Chromatins ist bei den Kernen der Knochenbildungszellen dicker als bei jenen der Chondroblasten, ihr Nukleolus bedeutend größer. Die Knochenbildungszellen besitzen ein stark entwickeltes endoplasmatisches Retikulum. Das Grundplasma ist auf schmale Straßen beschränkt, die kaum breiter als die Membranen und die zwischen ihnen gelegenen Zisternen sind. Die knochen nahen Zellabschnitte enthalten Mitochondrien mit dichter Matrix von ovoider bis rundlicher Gestalt.

Zwischen Knorpelmodell und Periostzellen liegt eine wechselnd breite Schicht *präossalen Gewebes* (Abb. 1). Die Anzahl der Fibrillen je Flächeneinheit des Schnittes ist merklich größer als im Perichondrium. Die Fibrillen stellen sich elektronenmikroskopisch scharf begrenzt dar und haben einen größeren Durchmesser als jene im Perichondrium bzw. Knorpel (vgl. Diskussion). Die Abgrenzung des präossalen Gewebes gegenüber dem Appositionsknorpel ist angesichts der genannten Fibrillenmerkmale eindeutig.

Bei größerer Dicke der präossalen Schicht steigt die Anzahl der Kollagenfibrillen je Flächeneinheit des Schnittes (Abb. 1). In einem gewissen Abstand von den Periostzellen legen sich Fibrillen zu Fibrillengruppen zusammen. Gleichzeitig treten drusenähnliche Ablagerungen von Kristallnadeln auf. Das präossale Gewebe läßt infolge des verschiedenen Verlaufs der Fibrillen eine *Schichtung* erkennen (Abb. 1). In Osteoblastennähe treten z.B. Fibrillenquerschnitte auf. In einer Entfernung von $0,3\text{--}0,4\ \mu$ folgt eine Schicht mit längsgeschnittenen Fibrillen. Die Fibrillen sind allerdings nur auf kürzere Strecken hin längs-

getroffen, so daß eine netz- oder gitterartige Ordnung der Fibrillen anzunehmen ist. Damit weist bereits das präossale Gewebe eine lamelläre Struktur auf.

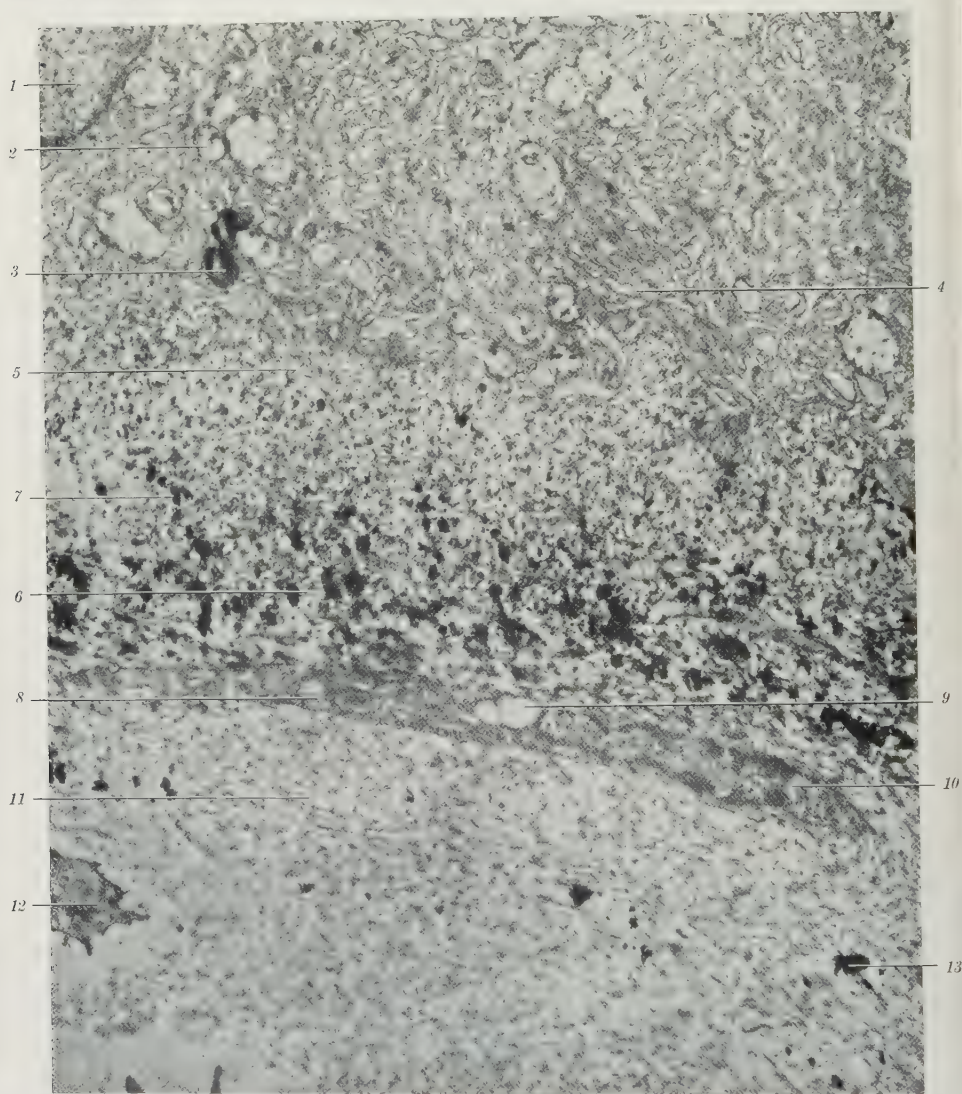


Abb. 1. Präossales Gewebe, etwa 5000 Å dick, dem Knorpelmodell aufgelagert. 1 Kern eines Osteoblasten. 2 Mitochondrien. 3 Osmiophile Einlagerungen. 4 Dichtgelagertes endoplasmatisches Retikulum mit verschiedenen weiten Zisternen. 5 Präossales Gewebe in Osteoblastennähe mit Fibrillenquerschnitten. 6 Präossales Gewebe mit überwiegend längsgeschnittenen Fibrillen. 7 Kristallhaufen, die zum Knorpel hin an Größe zunehmen. 8 Cytoplasma einer flachen Zelle mit wenigen Membranpaaren. 9 Größere Bläschen der flachen Zelle. 10 Kern der flachen Zelle. 11 Knorpel mit überwiegend längsgeschnittenen Fibrillen. 12 Chondrozyt. 13 Kleine Kalkkonkremente im Knorpelgewebe. Vergr. 7 700

In einiger Entfernung vom Diaphysenende ist häufig ein Wechsel zwischen mehreren einschichtigen Zellagen und Schichten von präossalem Gewebe zu beobachten (Abb. 2). Verschieden lange, relativ platte Zellen fügen sich mit ihrer Schmalseite, getrennt durch einen schmalen Interzellularspalt, aneinander. Mit-

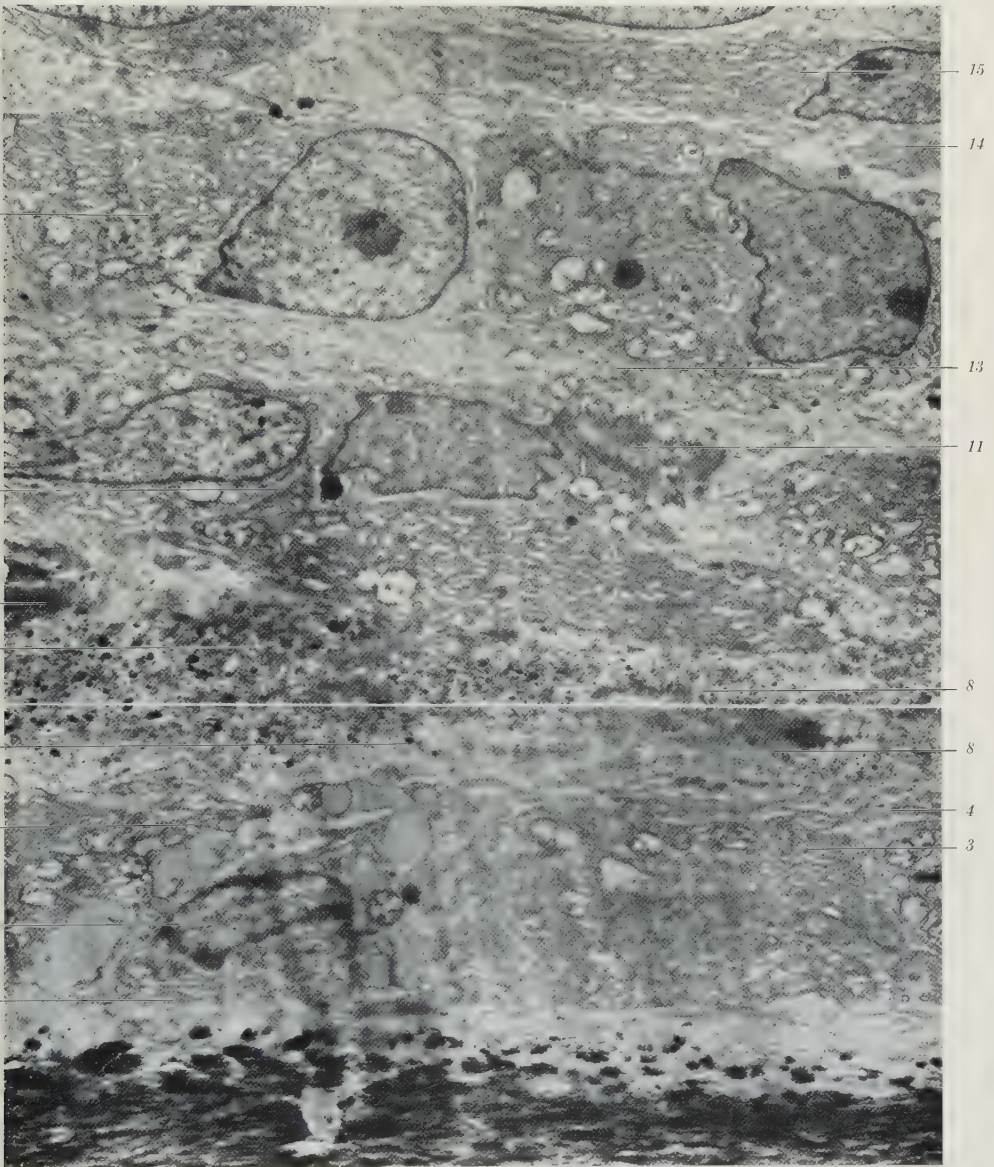


Abb. 2. Flache Knochenbildungszellen mit Einschaltung von präossalem Gewebe abgelagert auf voll mineralisiertes Knochengewebe. 1 Präossales Gewebe. 2 Kern eines Knochenbildners. 3 Endoplasmatisches Retikulum mit wenig erweiterten Zisternen. 4 Zellfortsätze. 5 Interzellularspalt zwischen zwei Zellen. 6 präossale Schicht mit kleinen Kalkablagerungen. 7 Lamellen mit quergeschnittenen Fibrillen. 8 Fibrillenübertritt von einer Lamelle mit Querschnitten in eine benachbarte Lamelle mit Schräg- und Längsschnitten. 9 Lamellen mit längsgeschnittenen Fibrillen und Kristalleinlagerungen. 10 Zweite Schicht der Knochenbildner mit deutlich abgegrenzten Zellen; endoplasmatisches Retikulum zeigt geringere Erweiterung der Zisternen. 11 Lamellenanlage mit schräggesechnittenen Fibrillen. 12 Knochenbildner der dritten Schicht. 13 schmaler Fortsatz einer Zelle, der sich der Längsseite der Nachbarzelle anlagert. 14 Interzellularraum der Fibroelastica mit geringer Fibrillenzahl. 15 Fibroblasten. Vergr. 4900

unter besitzen die Zellen eine mehrfach gebuchtete Oberfläche in der Form einer Zähnelung; in diesen Fällen sind benachbarte Zellen durch die Zähne eng ver-

bunden. Lange Fortsätze einer Zelle können sich der Längsseite der Nachbarzelle anlegen (Abb. 2). In der knochen nahen Zellage sind die Beziehungen der benachbarten Zellen zueinander so verwickelt, daß der Eindruck einer Einheit-

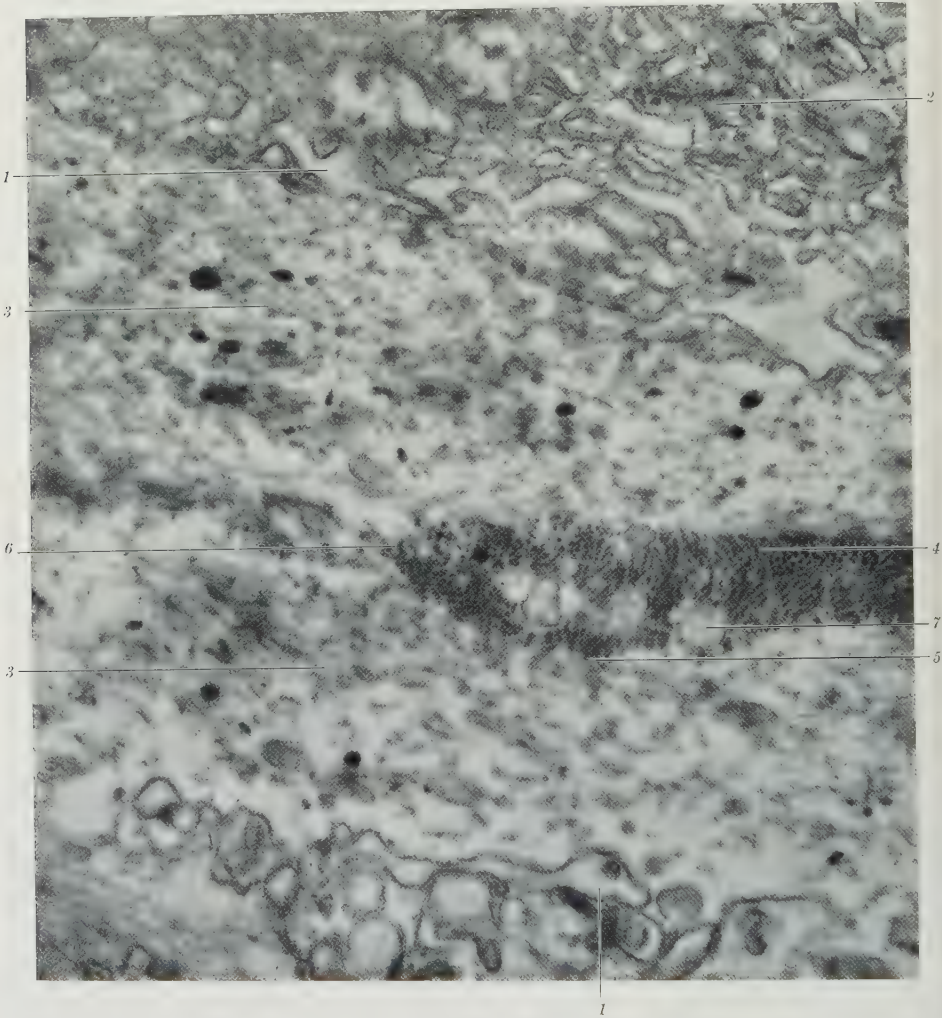


Abb. 3. Präossales Gewebe mit Lamellenschichtung. 1 Starke Erweiterungen der Zisternen in einem Osteoblasten. 2 Kleines Golgfeld? 3 Präossales Gewebe mit Fibrillenlängsschnitten und verschiedenen großen Kalkeinlagerungen. 4 Lamelle mit quergeschnittenen Fibrillen. 5 Fibrillenschrägschnitte, die Verbindung mit einer Nachbarlamelle aufnehmen. 6 Auskeilen der Lamelle, d.h. Übergang in eine Lamelle mit längsgeschnittenen Fibrillen. 7 Bläschen unbekannter Natur innerhalb der Lamelle (Reste von Zellorganellen?) Vergr. 16 000

lichen Cytoplasmaschicht mit mehreren Kernen entsteht. Der Kern liegt stets an einem Ende der flachen Zellen, aber einmal im proximalen, das andere Mal im distalen Ende der Zelle. So können die Kerne zweier benachbarter Zellen einen sehr geringen Abstand voneinander haben.

Die Struktur der Zellen in den einander folgenden Schichten des Periostes ist nicht gleichartig. Die peripher gelegenen Elemente sind breiter und kürzer; dem-

gemäß ist ihr Kern plumper und größer. Das Chromatin legt sich einmal als Randsaum der Kernmembran an, zum anderen wird das Kernareal verschieden dicht von dickeren Chromatinbrocken eingenommen. Nukleolen sind vorhanden. Der Zelleib weist ein ungewöhnlich dicht gelagertes, reichlich ausgebildetes endo-

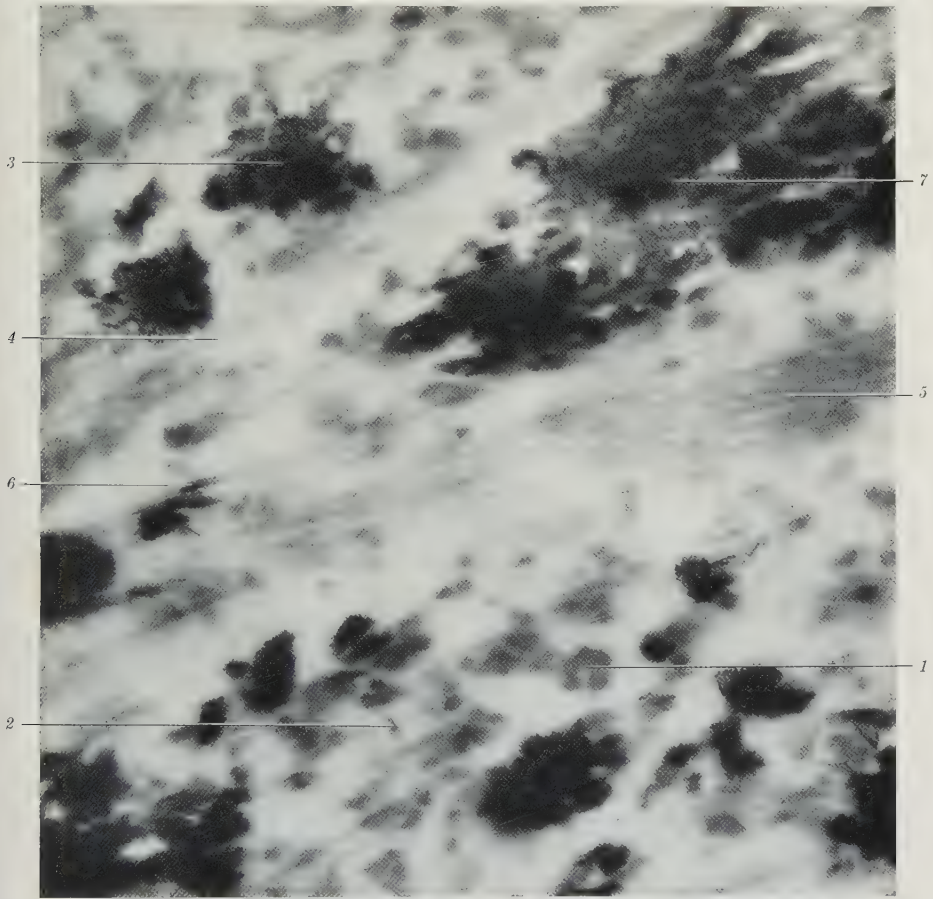


Abb. 4. Lamelläre Schichtung des präossalen Gewebes. 1 Querschnittene Fibrillenbündel. 2 Anlagerung von Einzelkristallen. 3 Querschnittenes Fibrillenbündel, vollständig mit Kristallen umhüllt. 4 Längsgeschnittene Fibrillen mit Unterteilung der Periode. 5 Bündel längsgeschnittener Fibrillen. 6 Kristallumhüllung einer einzelnen längsgeschnittener Fibrille. 7 Längsgeschnittene Fibrillen mit fast vollständiger Kristallumhüllung. Vergr. 54 000

plasmatisches Retikulum auf. In den peripheren Zellen des Periostes treten nur einige Zisternenerweiterungen auf, in den zentralen dagegen eine Reihe größerer Zisternensäcke von etwa 1μ Durchmesser. Das Grundplasma ist sehr dicht und fein granuliert. Die verschiedenen Zellschichten weisen hinsichtlich der Anzahl und Größe der Mitochondrien keine Differenzen auf. Sehr selten fanden wir Strukturen, die mit Vorbehalt als Teil des Golgi-Apparates anzusehen sind (Abb. 3).

Die peripheren Zellen des Periostes besitzen ein gut entwickeltes Plasmalemm. Bei den zentralen Zellen konnten wir auf unseren Aufnahmen in der Nachbar-

schaft des präossalen Gewebes dagegen auf größere Strecken hin keine Zellmembran erkennen: Interzelluläre Fibrillengruppen, mitunter bereits mit Einlagerung kleinerer Kristalldepots, schmiegen sich dem scheinbar nackten Cytoplasma unmittelbar an.

Zwischen den ersten, etwa 5μ breiten Zellen des Periostes und dem Knochen liegt eine annähernd 1μ breite Schicht von präossalem Gewebe mit größeren

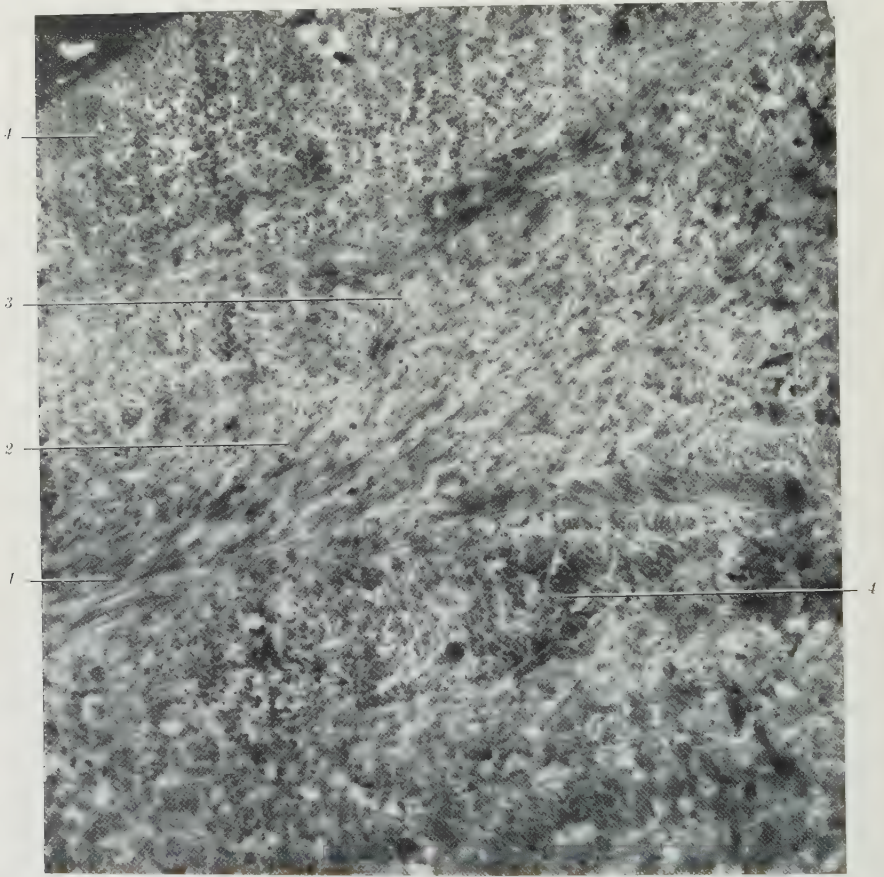


Abb. 5. Periostales Knochengewebe mit Tetracalcium (Versen) entkalkt. 1 Lamelle mit Fibrillenlängsschnitten, die Fibrillen lassen die Querstreifung erkennen. 2 Fibrillen, die in die Nachbarlamelle ausseren. 3 Fibrillenbündel, die die übernächste Lamelle mit längsgeschnittenen Fibrillen erreichen. 4 Lamellen mit Fibrillenquerschnitten. Vergr. 12 500

Kalkeinlagerungen. Von der ersten und zweiten Zellage wird ein 4μ dicker Streifen präossalen Gewebes eingeschlossen. Die Fibrillen innerhalb dieser zweiten Schicht sind dicht aneinander gefügt, d.h. ihre Dichte je Flächeneinheit ist relativ groß. In dem präossalen Gewebe sind mehrere, $1-1,5\mu$ breite Komplexe zu unterscheiden, in denen die Fibrillen entweder quer, schräg oder längs orientiert sind. Es liegt also wiederum eine *lamelläre* Ordnung der Fibrillen vor. Aus Schichten quergeschnittener Fibrillen scheren Fibrillen nach beiden Seiten aus, diese Fibrillen bilden Gruppen mit z.T. entgegengesetzter Verlaufsrichtung und treten in Nachbarlamellen mit längsgeschnittenen Fibrillen über. In diesem

präossalen Gewebe sind Haufen von Kristallen mit einem Durchmesser bis zu 4000 Å unregelmäßig verteilt.

Der Interzellularraum zwischen zweiter und dritter Zelle ist von wechselnder Breite und enthält nur in einzelnen Abschnitten dichtere Ansammlungen von Kollagenfibrillen. Auf Grund der Ordnung der Fibrillen ist diese Schicht jedoch als präossales Gewebe anzusehen. Jenseits der dritten Zelle folgt ein schmaler Interzellularspalt mit einer geringen Anzahl von Fibrillen in größerem Abstand voneinander; eine bestimmte Ordnung in der Fibrillenverteilung ist nicht zu erkennen. Die nächste Zelle mit länglich gestalteten Fibroblasten gehört der Fibroelastika an.

2. Die Ordnung der Fibrillen im präossalen Gewebe und im Knochengewebe

Das Knochengewebe der Ratte, die wir untersuchten, wurde bisher als Faserknochen beschrieben. Elektronenmikroskopisch fanden wir aber bereits im präossalen Gewebe eine lamelläre Struktur, d.h. einen schichtweisen Wechsel von Kollagenfibrillen verschiedener Verlaufsrichtung. Wir haben den Fibrillenverlauf im präossalen Gewebe bei noch fehlender bzw. noch nicht weit vorangeschrittener Kalkablagerung an Aufnahmen mit stärkerer elektronenmikroskopischer Grundvergrößerung (7000 bzw. 21000) genau untersucht (Abb. 3, 4). Die Dicke einer Lamelle beträgt etwa 7000—15000 Å. In der einzelnen Fibrillenlamelle ist eine Streichrichtung bevorzugt, aber keine streng parallele Anordnung der Fibrillen festzustellen. Neben fast reinen Querschnitten von Fibrillen finden sich Schrägschnitte in wechselnder Richtung, auf der anderen Seite neben Längsschnitten wiederum Schrägschnitte (Abb. 3). Mehrere nebeneinanderliegende längsgestreckte Fibrillenbündel lassen eine Verflechtung unter spitzem Winkel erkennen (Abb. 4). Am Ende einer Fibrillenlamelle scheren Fibrillen in die Nachbarschicht aus bzw. es kann am Ende einer Schicht quergetroffener Fibrillen ein Übergang in eine Lamelle mit längsgeschnittenen Fibrillen erfolgen.

In einem Knochengewebe mit vollständiger Mineralisierung ist die Ordnung der Fibrillen elektronenmikroskopisch nicht mehr auszumachen (KNESE und KNOOP 1958, KNESE 1959b, c). Nach Entkalkung voll ausgebildeten Knochengewebes mit Titriplex (Versen) sind wiederum Lamellen zu beobachten (Abb. 5). Die Lamellen haben den gleichen Aufbau wie die Lamellen des sog. feinfaserigen lamellären Knochengewebes (KNESE, VOGES und RITSCHL 1954, KNESE 1958, 1959b, c). An einen schmalen Lamellenkern schließt sich eine kamm- oder sägeartige Zone an, in der eine Fibrillenverbindung mit Nachbarlamellen stattfindet. Außer Fibrillen, die unmittelbar in die Streichrichtung der Nachbarlamellen umbiegen, durchsetzen andere Fibrillen die Nachbarlamellen und erreichen die übernächste Lamelle mit gleicher Fibrillenordnung.

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen sprechen dafür, daß die Fasern des chondralen Knochens anders als die des periostalen geordnet sind (KNESE, VOGES und RITSCHL 1954, KNESE 1957). An entkalktem, relativ jungem *chondralen Knochen* ist auch elektronenmikroskopisch eine Fibrillenordnung zu beobachten, die von der des periostalen Knochens abweicht. In etwa bis zu 5–8 μ breiten Zonen herrschen quer- bzw. längs- oder schräggesechnittene Fibrillen vor (Abb. 6). Zwischen zwei Gebieten unterschiedlicher Faserordnung treten breite Streifen einer Durchdringung von Fibrillen verschiedener Verlaufsrichtung auf.

Im Hinblick auf die Beobachtungen im polarisierten Lichte (s. unten) möchten wir daher annehmen, daß diese Fibrillenschichten Lamellen von einer größeren Dicke darstellen als sie in jungem periostalem Knochen vorhanden sind.

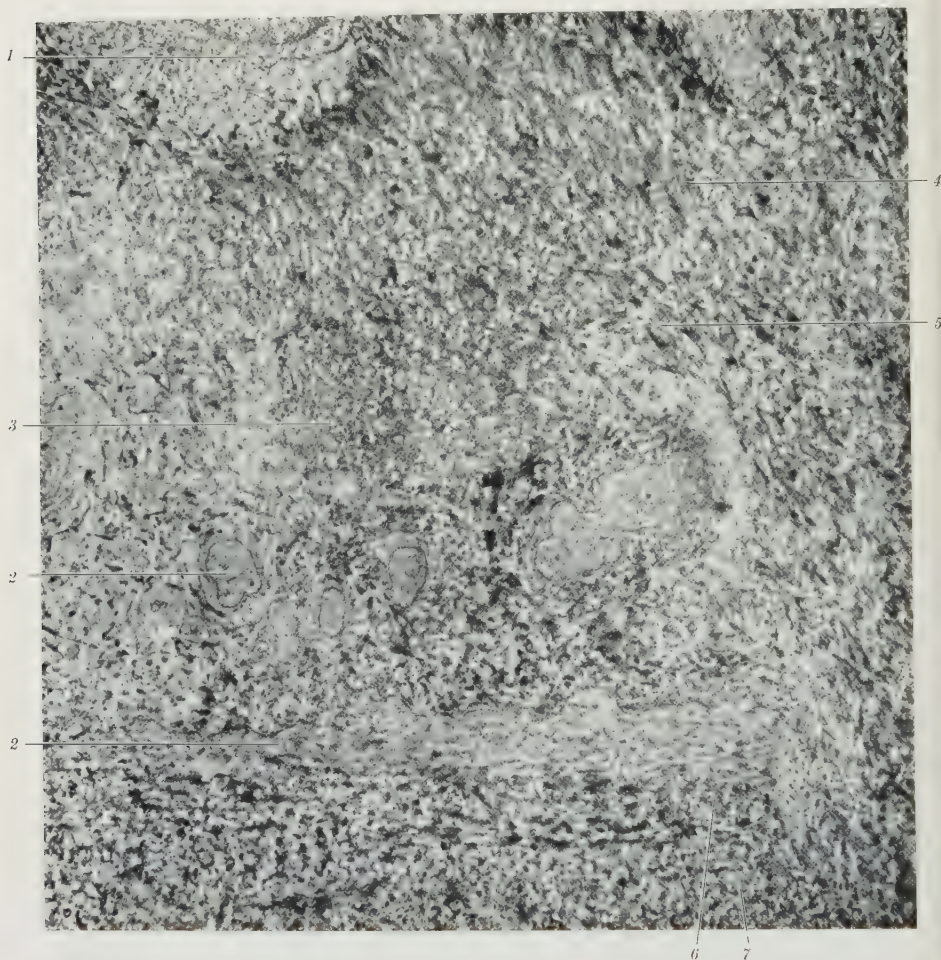


Abb. 6. Entkalkter (Titriplex -Versen) chondraler Knochen. 1 Junger, noch nicht vollständig umhüllter Osteozyt. 2 Reste von Knorpelsubstanz. 3 Lamellenanlage mit quergeschnittenen Fibrillen. 4 Lamellenanlage mit längsgeschnittenen Fibrillen. 5 Übergangszone zwischen zwei Lamellen. 6 Lamelle mit überwiegend längs- bzw. schräggesechnittenen Fibrillen. 7 Lamelle mit quergeschnittenen Fibrillen. Vergr. 5 200

Nach unseren früheren Untersuchungen (KNESE und KNOOP 1958) beträgt die Periode der Kollagenfibrillen in Osteblastennähe im Mittel 290 Å. Die Fibrillendicke mißt bis zu einem Abstand von $0,75 \mu$ vom Osteblastenrand 300 Å, von $0,75$ — $1,5 \mu$ 356 Å und zwischen $1,5$ — $2,25 \mu$ 430 Å. In entkalktem periostalem Knochen fanden wir die gleiche Dicke; die Periode ist hier aber auf etwa 500 Å angewachsen. Die Fibrillendicke mißt in entkalktem enchondralen Knochen 800 Å, die Periode 400 Å.

Wir haben bei der Beschreibung des präossalen Gewebes verschiedentlich auf die große Anzahl der Fibrillen je Flächeneinheit des Schnittes hingewiesen. Die

„Flächendichte“ der Fibrillen läßt sich zuverlässig nur an größeren Gruppen quergeschnittener Fibrillen messen. Der unterschiedliche Schrumpfungsgrad verschiedener Präparate ist leider nicht zu bestimmen. Die Flächendichte der Fibrillen in Osteoblastennähe beträgt 340 Fibrillen je $1 \mu^2$, im Abstand von 1,5 bis $2,25 \mu$ vom Osteoblastenrand noch $300/\mu^2$, in nicht mineralisiertem präossalem Gewebe (Abb. 3) $220/\mu^2$ und in entkalktem periostalen Knochen (Abb. 5) $90/\mu^2$. Die Flächendichte der Fibrillen nimmt demgemäß mit Reifung der Fibrillen, d.h. mit Vergrößerung der Periode und Zunahme der Fibrillendicke ab.

3. Flache Zellen (verdämmernde Zellen)

Ein besonderes Augenmerk mußte bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen auf jene Zellen gerichtet werden, die sowohl für den Knorpel (SCHAFER 1930) als auch für den Knochen (Literatur bei KNESE 1956) als verdämmernde Zellen bezeichnet wurden. Lichtmikroskopische Untersuchungen konnten über die Bedeutung dieser Zellformen keine befriedigende Auskunft geben. Demgemäß haben elektronenmikroskopische Beobachtungen zu klären, ob bei diesen verdämmernden Zellen eine Degeneration oder eine letzte sekretorische Leistung der Zelle im Sinne von PETERSEN (1935) vorliegt. Es empfiehlt sich, mit diesen flachen Zellen ähnliche Zellformen zu vergleichen, bei denen vermutlich eine echte Degeneration vorliegt. Wir haben daher auch die Zellen des Gelenkknorpels untersucht.

In größeren Abschnitten der Oberfläche des *Gelenkknorpels* von Rattenfetten verlaufen die Fasern der Interzellulärsubstanz überwiegend tangential; dies ist für den ausgebildeten Gelenkknorpel bekannt (BENNINGHOFF 1925). In geringem, aber wechselndem Abstand folgt unter dieser Tangentialfaserschicht die Interzellulärsubstanz des sog. hyalinen Epiphysenknorpels. Unmittelbar unter, z.T. auch innerhalb der Tangentialfaserschicht liegen Chondrocyten. In ihrer elektronenmikroskopischen Struktur gleicht ein Teil dieser Zellen den Knorpelzellen des hyalinen Epiphysenknorpels (KNESE und KNOOP 1961a). Sie besitzen ein dichtes Hyaloplasma (Abb. 7), ein mäßig entwickeltes endoplasmatisches Retikulum mit wenig erweiterten Zisternen; ihr Kern enthält ein annähernd gleichmäßig verteiltes Chromatin. Im allgemeinen trennt ein feiner Saum von Interzellulärsubstanz diese Zellen vom Gelenkspalt.

Neben diesen Chondrozyten ist eine ganze Reihe von Zellen zu beobachten, die sich — nach dem morphologischen Zustand zu urteilen — in einem verschieden weit vorangeschrittenen Zerfall befinden. Diese Zellbilder sind schwer zu beurteilen, da unter anderem die Zellorganellen zerstört sind oder nur noch als Trümmer vorliegen. Die Zuordnung bestimmter Strukturen zu den bekannten Organellen kann demgemäß häufig nur vermutungsweise erfolgen. Die untersuchten Gebilde behalten aber einen engen Kontakt mit der Interzellulärsubstanz, so daß größere Zerstörungen durch die Präparation wahrscheinlich nicht vorliegen.

Bei einigen flachen Zellen innerhalb der Tangentialfaserschicht tritt eine erhebliche Reduktion des Cytoplasmas auf, so daß ihr Kern an den Längsseiten nur noch von einem schmalen Cytoplasmasaum überzogen ist. Die sich dem Kern beiderseits anschließenden Cytoplasmahauben enthalten einige Membranpaare des endoplasmatischen Retikulums sowie Mitochondrien (Abb. 7).

Wir fanden in der Gelenkoberfläche weiterhin schmale Gebilde von etwa 3000 Å Breite, die scheinbar nackt in die Interzellulärsubstanz eingebettet sind

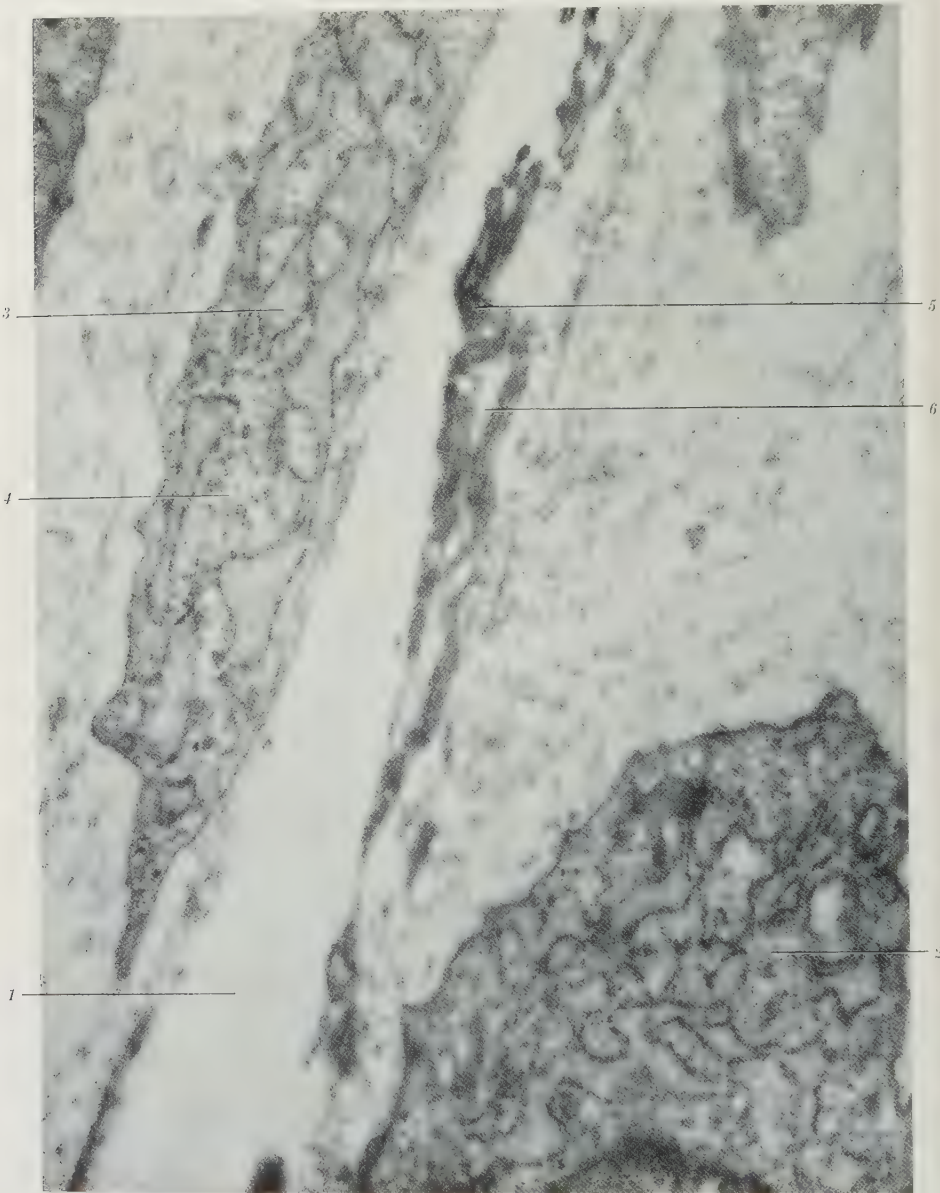


Abb. 7. Gelenkknorpel. 1 Gelenkspalt. 2 Rundlicher Chondrozyt mit erweiterten Zisternen, dichtem Grundplasma und osmiophilen Einlagerungen. 3 Zisternen eines länglichen Chondrozyten, der nur von einer dünnen Schicht Interzellulärsubstanz zum Gelenkspalt hin überkleidet ist. 4 Grundplasma dieses Chondrozyten mit relativ großen (300 Å und mehr) Granula. Degenerierende Zellen: 5 Reste des Grundplasmas. 6 Leere Zisternenräume (?). Vergr. 26 500

(Abb. 8). Diese Elemente enthalten Granula verschiedener Größe, deren Natur nicht zu bestimmen war. Daneben erscheinen Bläschen, von denen einige Reste



Abb. 8. Gelenkknorpel. 1 Gelenkspalt. 2 Mitochondrien in einer verdämmernden Zelle; degenerierende Zelle. 3 Zellkern. 4 Grundplasma. 5 Erweiterte Zisternen. 6 Mitochondrium. 7 Chondrozyt. Vergr. 24 000

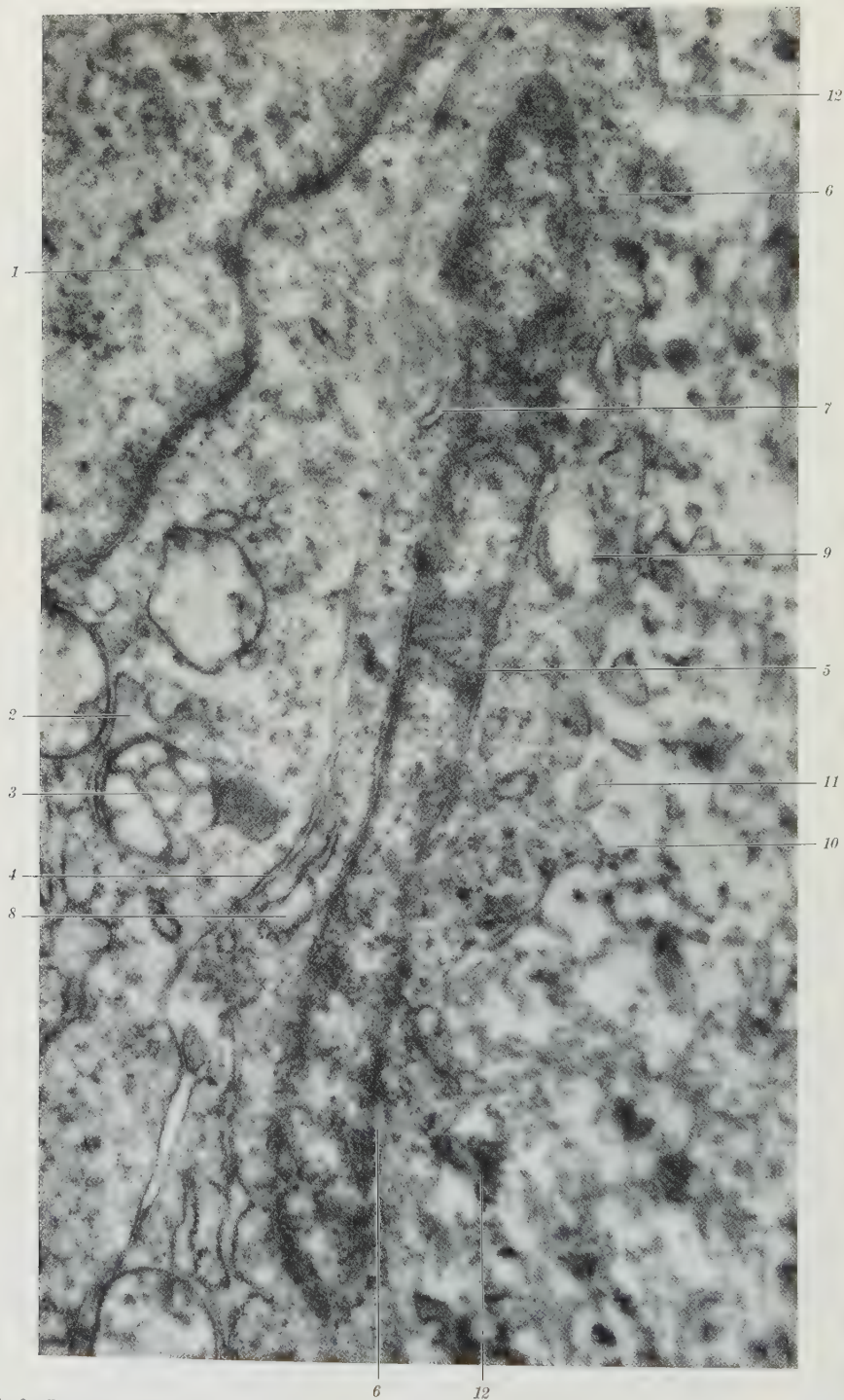


Abb. 9. Flache Zellen zwischen Perichondrium und Knorpel. Chondroblast: 1 Zellkern. 2 Zisterne. 3 Mitochondrium. 4 Interzellularspalt. Flache Zelle: 5 mittlerer Teil des stäbchenförmigen Zellkernes mit deutlich sichtbaren Kernmembranen. 6 Kolbige Auftreibung des Zellkernes an den Enden mit z. T. schwer kenntlichen Kernmembranen. 7 Kurzes Membranpaar des endoplasmatischen Retikulums. 8 Gering erweiterte Zisterne. 9 Mitochondrium. 10 Ausbuchtung der Zelloberfläche (Zellfuß). 11 Isolierter Zellfuß. 12 Der Zelle anliegende Fibrillenquerschnitte. Vergr. 30 000

von Membranen aufweisen; wir halten diese Bläschen für zerfallende Mitochondrien. Dementsprechend sind wohl die beschriebenen Elemente innerhalb der Gelenkoberfläche als degenerierende Zellen anzusehen.

In geringer Entfernung vom Gelenkspalt (etwa 6000—7000 Å) beobachteten wir noch eine andere Art degenerierender Zellen (Abb. 8). Diese Elemente weisen ein stark verästeltes Hohlraumsystem von 3000—4000 Å Breite auf — Zisternen des endoplasmatischen Retikulums —, das mit einer locker gefügten Substanz gleichmäßig erfüllt ist. Die Hohlräume werden durch z.T. anscheinend schwer geschädigte Membranen von dem restlichen Anteil des Zelleibes getrennt. Dieser zweite Zellanteil erscheint im Schnittbild in Gestalt etwa 1500 Å breiter Streifen, die aus einer elektronenmikroskopisch dichten Substanz ohne erkennbare Struktur aufgebaut sind. Da innerhalb dieses dichten Materials stark geschädigte Mitochondrien und vermutlich auch Kernreste liegen, glauben wir, daß es sich bei diesem Zellabschnitt um das sog. Grundplasma handelt. Unmittelbar in der Gelenkoberfläche können Zelltrümmer auftreten, die dem eben geschilderten Grundplasma in ihrem Bau gleichen (Abb. 7). Zwischen diesen dichten Streifen liegt noch ein Hohlraumsystem, das aber nicht mehr nach Art von Zisternenspalten abgeschlossen ist und elektronenmikroskopisch leer erscheint.

In den geschilderten Elementen haben wir wohl Zustände einer sog. echten Zelldegeneration vor uns. Auf

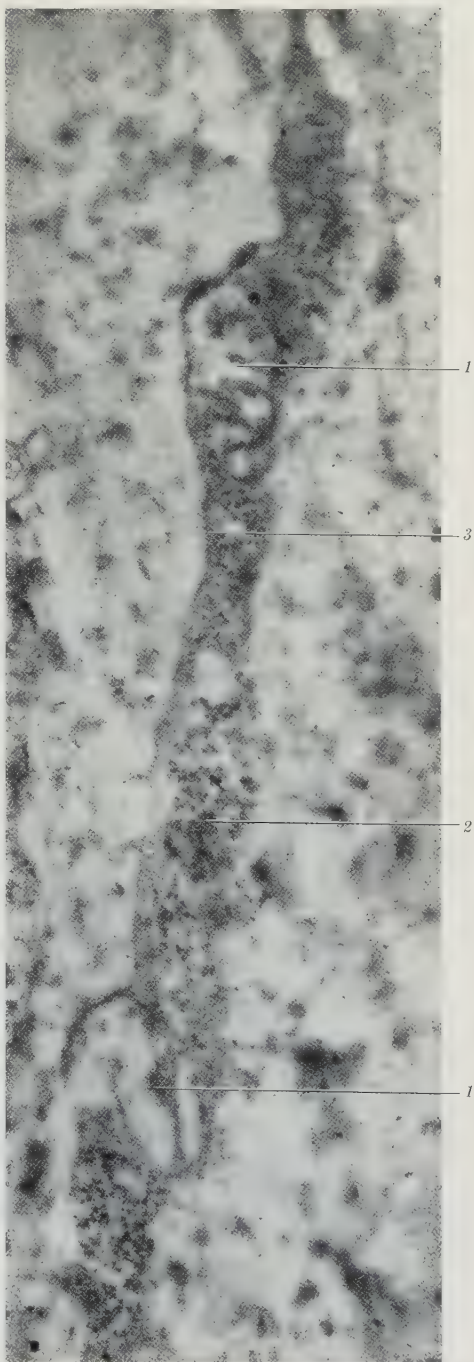


Abb. 10. Zellschatten. 1 Mitochondrien. 2 Grundplasma mit großen Granula. 3 Zellmembran.
Vergr. 51 000

etwas verschiedenem Wege kommt es zu einem Zerfall der Zellorganellen, der zu einem Trümmerfeld führt, das mitunter kaum noch als Zelle angesprochen werden kann. Wie dieser Zerfall vor sich geht und auf welchem Wege die Trümmer endgültig verschwinden, konnten wir nicht ermitteln.

Nach dieser Bemerkung über die Struktur der degenerierenden Zellen des Gelenkknorpels wenden wir uns der Beschreibung von Zellformen in der Über-

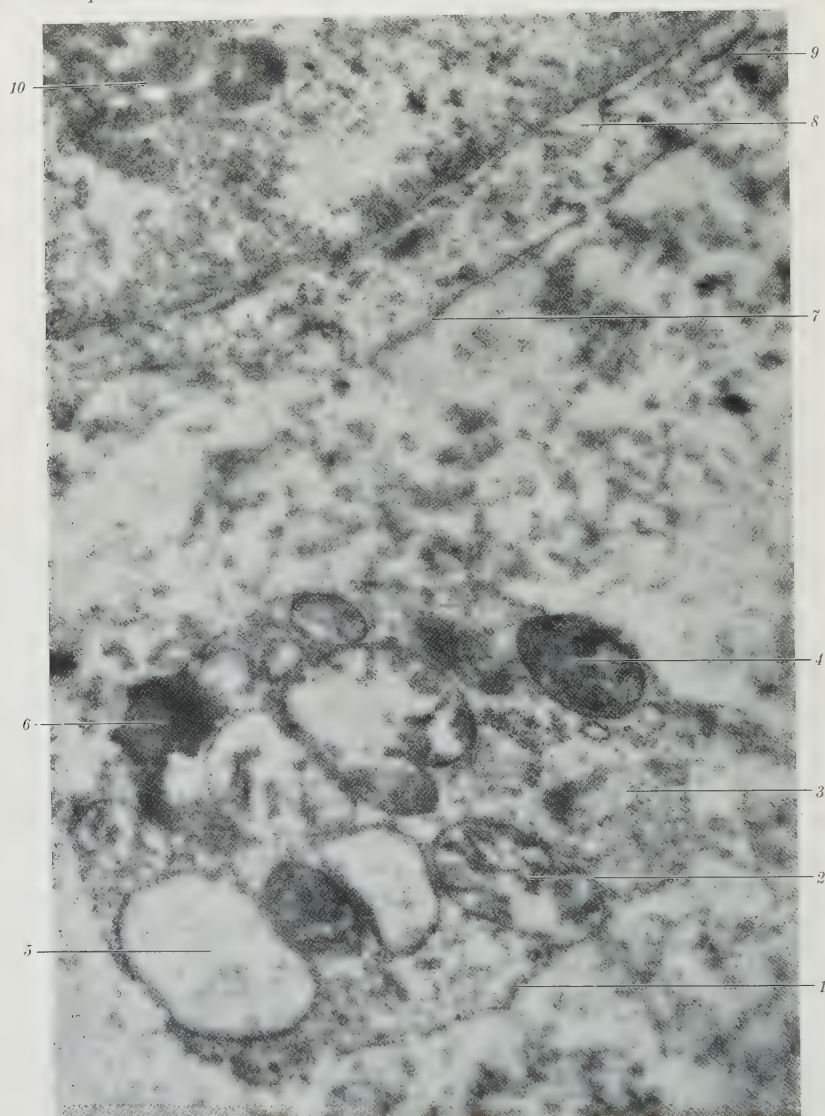


Abb. 11. Verdämmernde Zelle des Knorpels. 1 Zellmembran. 2 Mitochondrium mit Cristae. 3 Reste des Grundplasmas. 4 Mitochondrium mit dichter Matrix (?). 5 Bläschen von einer Membran umhüllt, die an ihrer Außenseite Granula trägt (Zisterne?). 6 Osmiophile Einlagerung. 7 Zellmembran eines benachbarten Chondroblasten. 8 Erweiterung des perinukleären Raumes. 9 Endoplasmatisches Retikulum. 10 Nukleolus. Vergr. 36 500

gangszone zwischen Perichondrium und Knorpel bzw. Periost und Knochen zu. Abgesehen von dem Einschluß von Bildungszellen in Form von Chondrozyten oder Osteocyten in die Interzellulärsubstanz ist eine Reihe andersartiger, aber gleichfalls unter sich sehr differenter Zellformen in den peripheren Knorpel- bzw. Knochenschichten zu beobachten.

An der Grenze von Perichondrium zum Knorpel liegen in Diaphysennähe lange *schmale Zellen*, die von den nach peripher sich anschließenden Chondroblasten durch einen interzellulären Spaltraum von 500 Å Breite gesondert sind

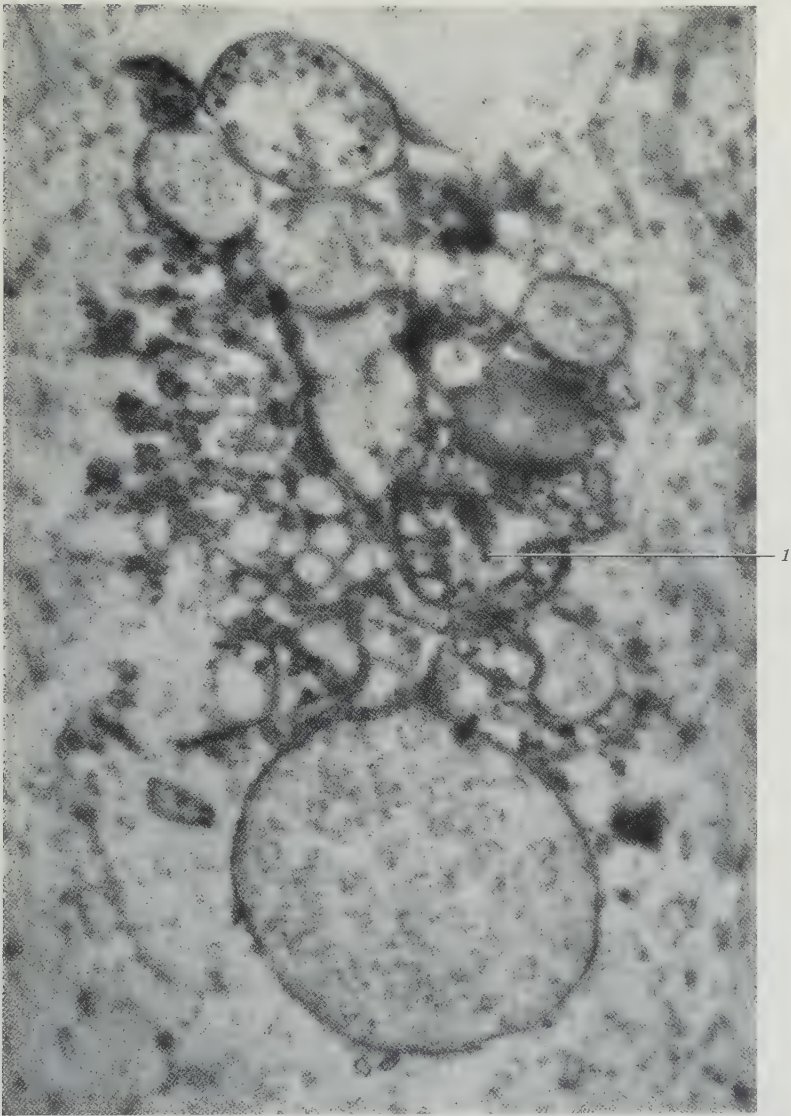


Abb. 12. Verdämmernde Zelle ohne Zellmembran: von den Zellorganellen ist nur noch ein Mitochondrium (1) durch Reste der Cristae zu diagnostizieren. Vergr. 37 000

(Abb. 9). Die benachbarte Interzellulärsubstanz unterscheidet sich von der restlichen Knorpelsubstanz durch das Vorhandensein relativ dicker Fibrillen von 400—600 Å, z. T. bis 800 Å Durchmesser; der Durchmesser der Knorpelfibrillen beträgt im allgemeinen 200—300 Å (vgl. auch GODMAN und PORTER 1960). Die Fibrillen liegen in Gruppen eng aneinander geschmiegt, z.T. unmittelbar der

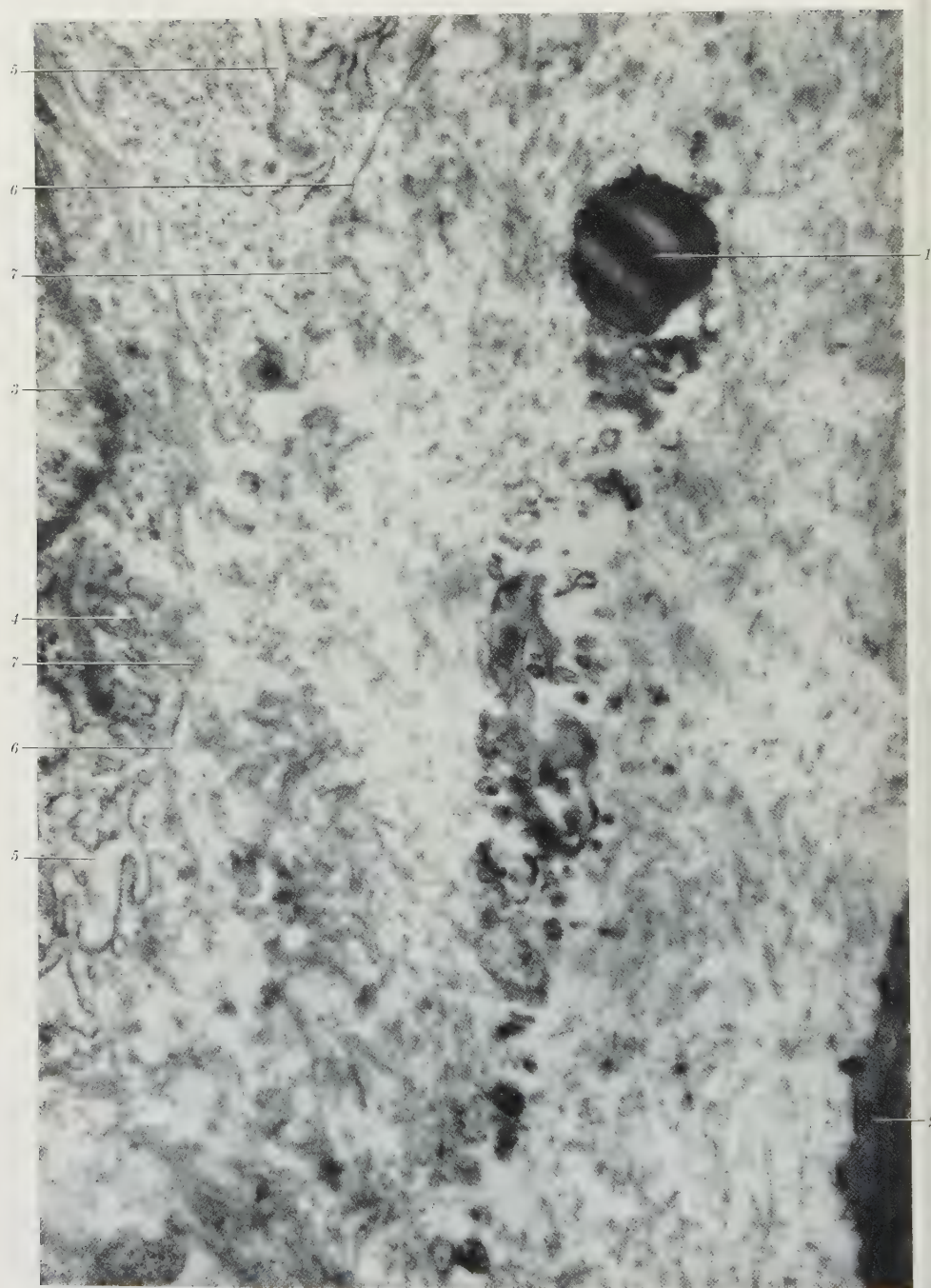


Abb. 13. Verdämmernde Zelle im Appositionsknorpel: von den Zellorganellen ist nur noch eine osmio-
phile Einlagerung (1) zu erkennen. 2 Chondrozyt. Chondroblasten: 3 Zellkern. 4 Mitochondrium.
5 Erweiterte Zisterne. 6 Scharf gezeichnetes Plasmalemm. 7 Unscharf gezeichnetes Plasmalemm.
Vergr. 20 000

Zellwand benachbart. Innerhalb einer Fibrillengruppe herrscht eine gleichartige Orientierung vor, d.h. die Fibrillen erscheinen auf unseren Aufnahmen entweder quer-, schräg- oder längsgetroffen.

Das Perikaryon der flachen Zellen von etwa 1μ Breite an der Perichondrium-Knorpelgrenze enthält fein granuläres dichtes Grundplasma, in das vereinzelt größere Granula (Palade-Granula?) eingelagert sind (Abb. 9). Ein endoplasmatisches Retikulum fehlt oder ist nur in Form einzelner Membranen z.T. von sehr geringer Länge vorhanden. Mitochondrien sind dagegen, wenn auch in kleiner Anzahl, stets anzutreffen. Der Kern ist schmal und lang, das Chromatin liegt der Kernmembran in groben Ballen an. Einzelne Verbindungen zwischen beiden Schichten des randständigen Chromatins treten auf; vielleicht handelt es sich hierbei nur um Tangentialschnitte durch randständiges Chromatin. Der perinukleäre Raum ist erweitert. An den Enden der stäbchenförmigen Kerne konnten wir häufig überhaupt keine Kernmembran mehr erkennen (Abb. 10).

In einem Abstand vom Perichondrium liegen in der peripheren Knorpelzone wechselnd gestaltete Zellreste. Einmal beobachteten wir schmale, zwischen 1300 und 2700 Å breite bandartige Zellelemente, deren feinkörniges, fast homogenes Cytoplasma gröbere Granula enthält (Abb. 11). Durch stark geschädigte Mitochondrien sind diese bandartigen Zellen von Zeit zu Zeit aufgetrieben. Diese Zellreste sind somit in ihrer Struktur einem Teil der Elemente des Gelenkknorpels (Abb. 8) sehr ähnlich.

Wir sahen weiterhin im Appositionsknorpel Bilder eines verschieden weit vorgeschrittenen *Zellunterganges*, die sich zu einer „morphologischen Reihe“ ordnen lassen. Am Anfang dieser Reihe stehen Zellreste, in denen einzelne Zellorganellen, vor allem Mitochondrien und osmiophile Einlagerungen, festzustellen sind. Diese Haufen von Zellorganellen können noch von einem Palsmalemm umschlossen sein (Abb. 12), andere liegen nackt ohne Zellmembran in der Interzellularsubstanz (Abb. 13). Das Ende dieser Reihe des Zellunterganges bilden Trümmerzonen, deren Bestandteile ihre Herkunft aus den bekannten Zellorganellen kaum noch erkennen lassen. Die Trümmerfelder sind entweder aus sehr verschiedenartig gestalteten einzelnen Gebilden aufgebaut, die als Granula oder Bläschen erscheinen, oder aus einer dichten strukturlosen Substanz in Form eines Bandes von geringer Breite (3000 Å). Wir konnten in diesen Zelltrümmern keine Strukturelemente des Kernes auffinden.

Die bisher beschriebenen Stadien eines Zellunterganges liegen im Appositionsknorpel. Ähnliche lange schmale Zellen können auch an der Grenze Knorpelpräossales Gewebe auftreten (Abb. 14). Der Kern solcher Zellen ist lang und wurstförmig mit einer Breite von etwa 2400 Å und einer Länge von 46000 Å. Das eine Ende des abgebildeten Kernes ist kopfförmig aufgetrieben und grenzt an eine schlauchförmige Vakuole. Man gewinnt den Eindruck, daß der restliche Teil des Kernes von einem erweiterten perinukleären Raum umgeben ist, wie er bereits geschildert wurde (Abb. 9, 10). Dieser Spaltraum besteht beiderseits des Kernes aus verschiedenen langen Abschnitten mit einer Breite zwischen 150 und 450 Å. Von der Knorpelseite her wird der Spaltraum von einem 400—500 Å breiten Streifen begrenzt, der zum Knorpel und zu dem beschriebenen Spaltraum hin eine Membran besitzt. Diese Streifen haben an verschiedenen Orten Verbindung mit

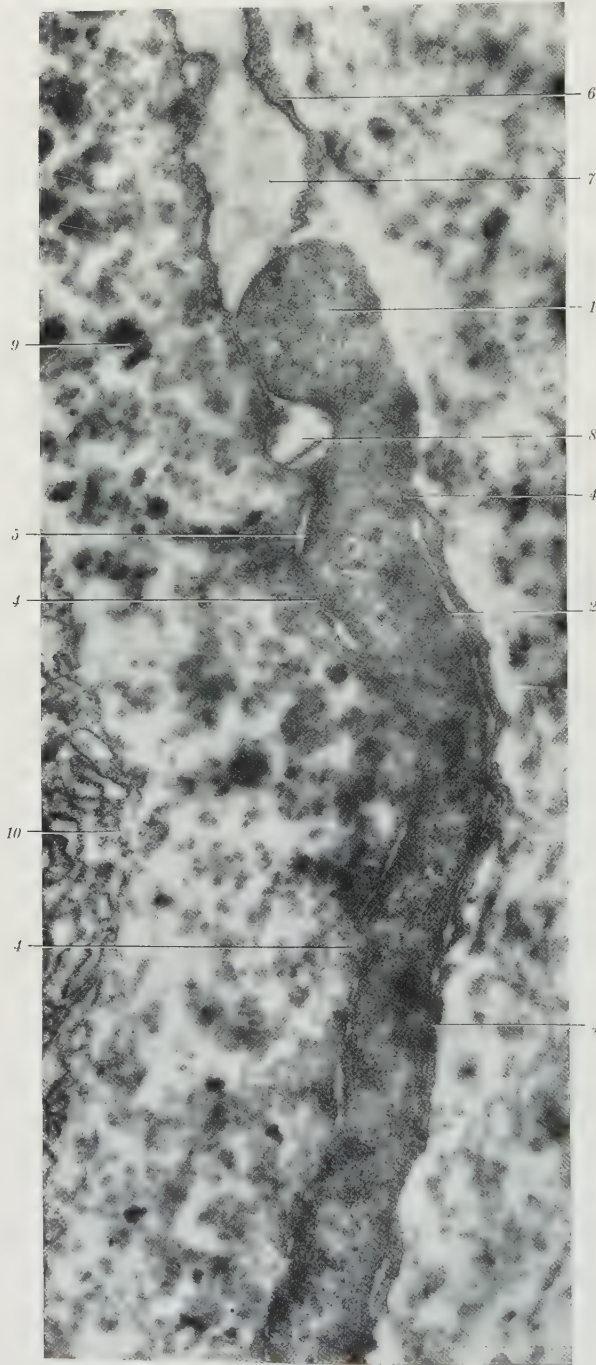


Abb. 14 a

12 Grundplasma mit Granula. 13 Mitochondrium. 14 Bläschen (Zisterne?). 15 Zellmembran. 16 Kern eines benachbarten Chondrozyten. 17 Perinukleäre Blase (vgl. Abb. 16a). Vergr. 30 000. (Die Zelle ist in zwei Hälften reproduziert: a obere, b untere Hälfte)

der Kernsubstanz. Dabei gehen die beiderseits begrenzenden Membranen in jene des Kernes über.

Das beschriebene Bild bereitet hinsichtlich der Zuordnung der einzelnen Elemente zu den bekannten Zellstrukturen große Schwierigkeiten. Die sich an den Spaltraum nach außen anschließende Substanz gleicht in ihrer Struktur der des Kernes. Wir vermuten daher, daß der Spaltraum kein perinukleärer Spalt ist, sondern durch eine Einbuchtung der Kernoberfläche entsteht. Für diese Auffassung spricht auch, daß die beiderseits begrenzenden Membranen am Ende des Spaltes ineinander übergehen. Die Vermutung, daß der Spaltraum auch an seiner Außenseite von Kernsubstanz begrenzt wird, findet eine weitere Bestätigung durch den Nachweis verbindender Kernporen, um die sich etwa 150 Å messende Granula in dichten Haufen ansammeln. An den Längsseiten des Kernes sind Anteile eines Zelleibes nicht aufzufinden. Dieses elektronenmikroskopische Bild entspricht damit dem der sog. nackten Kerne, wie sie auf Grund lichtmikroskopischer Beobachtungen beschrieben wurden (Literatur bei KNESE 1956).

Abb. 14 a u. b. Flache Zelle an der Grenze von Knorpel und präossalem Gewebe. 1 Kopfartige Auftreibung des Kernes. 2 Mehrfach unterbrochener, den Kern umgebender Spaltraum. 3 Ende des Spaltraumes auf der Knorpelseite. 4 Kernporen. 5 Spaltraum an der Seite zum präossalen Gewebe. 6 Cytoplasmasaum (?).

Ferner sind die Beziehungen des an beiden Längsseiten nackten Kernes zur umgebenden Interzellularsubstanz zu untersuchen. Auf der Seite zum Knorpel hin ist der Kern von einer Membran begrenzt. Eine Membran auf der Seite des präossalen Gewebes konnten wir nicht überall nachweisen; damit entsteht der Eindruck einer unmittelbaren Verbindung zwischen Kernsubstanz und präossalem Gewebe. Wir geben diesen Befund als Beschreibung der uns vorliegenden Aufnahmen wieder und sind uns bewußt, daß auf Grund der unterschiedlichen Struktur von Perichondrium bzw. Periost einerseits und Knorpel bzw. Knochen andererseits die *Möglichkeit einer Artefaktbildung* vorliegt. Jedoch ist zu beachten, daß der vorliegende enge Kontakt zwischen Kern und Interzellularsubstanz eine stärkere Schrumpfung ausschließt.

Gleiche Vorsicht scheint uns bei Beurteilung der Beziehungen zwischen Kern und Cytoplasma angebracht. An den schlauchförmigen Kern (Abb. 14) schließen sich beiderseits Elemente des Zelleibes an. Der Kern flacher Zellen läuft häufig an einem Ende zugespitzt aus. An diesem Ende ist die Abgrenzung des Kernes gegenüber dem anschließenden Cytoplasma recht schwierig. Die Grenze zwischen Cytoplasma und Kern liegt

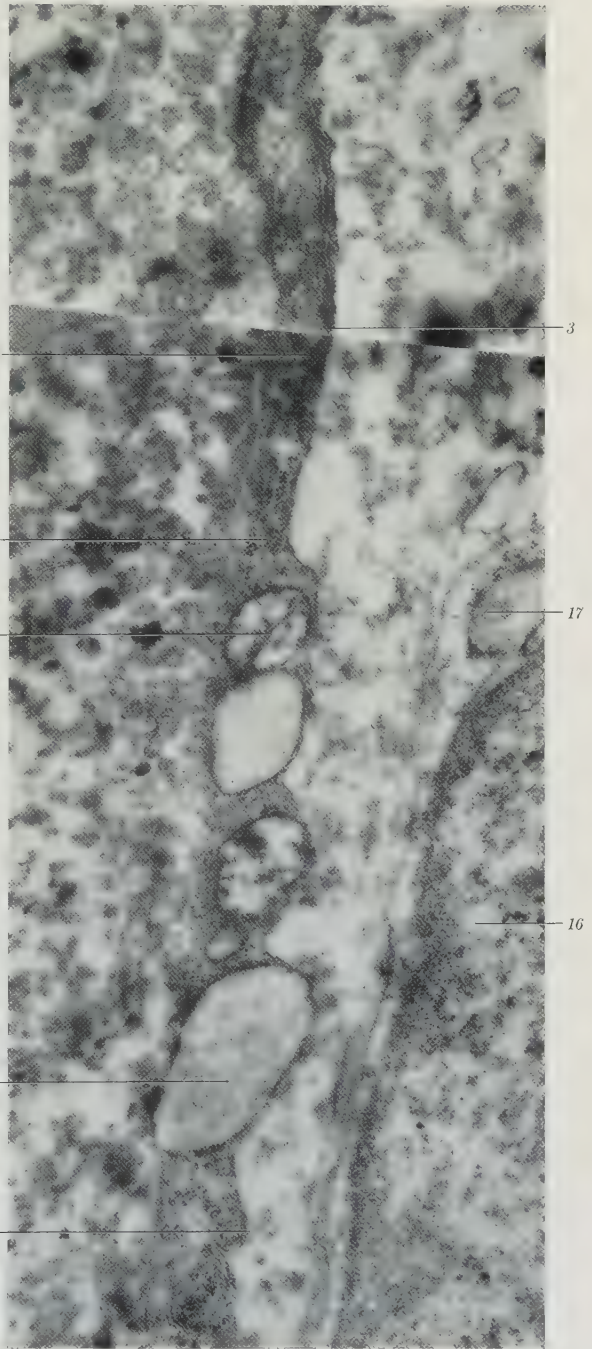


Abb. 14 b

vermutlich in jener Zone, in der eine relativ dichte Ansammlung von Granula mit etwa 150 Å Durchmesser auftritt. In diesen Zellabschnitten sind auch Mitochondrien und vesikuläre Gebilde zu beobachten.

Die beschriebene flache Zelle (Abb. 14) grenzt peripher an einen Streifen präossalen Gewebes, dem sich von der anderen Seite her ein Osteoblast anlegt.

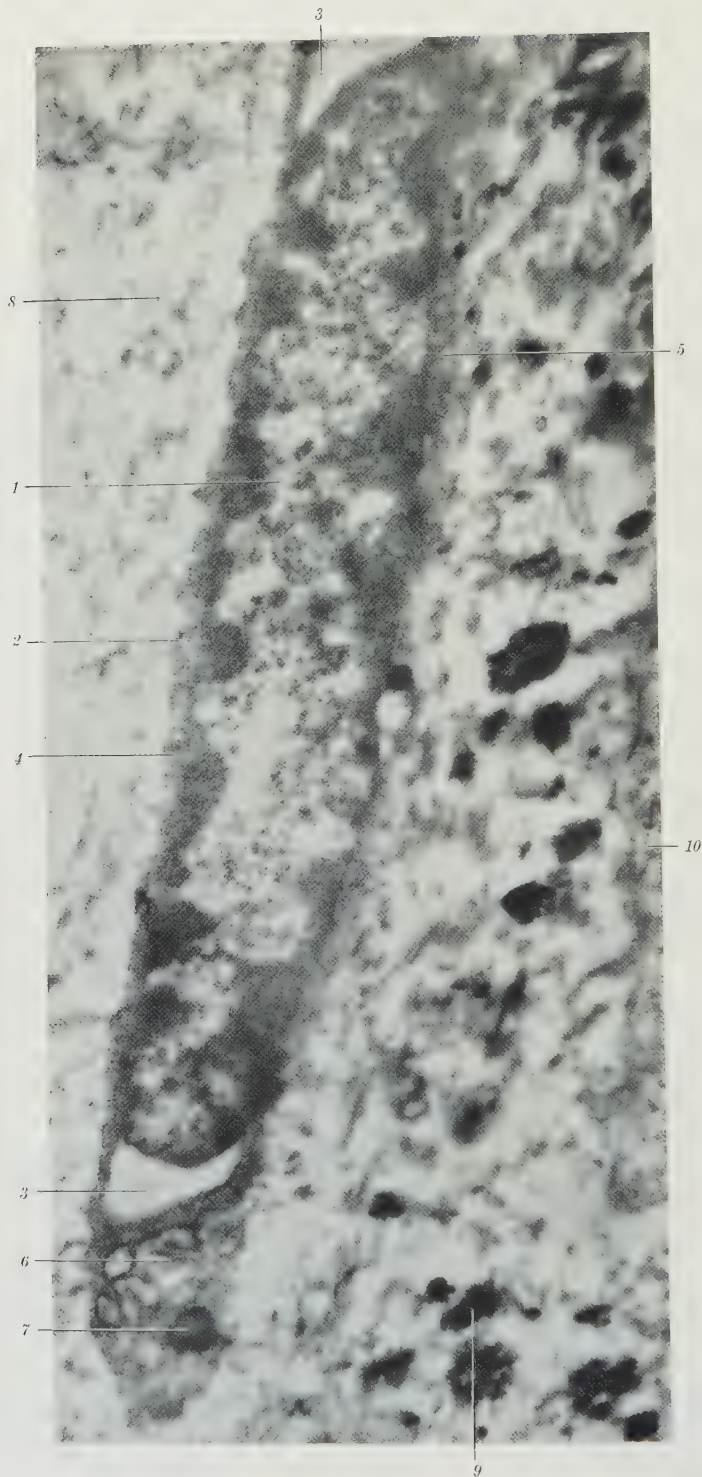
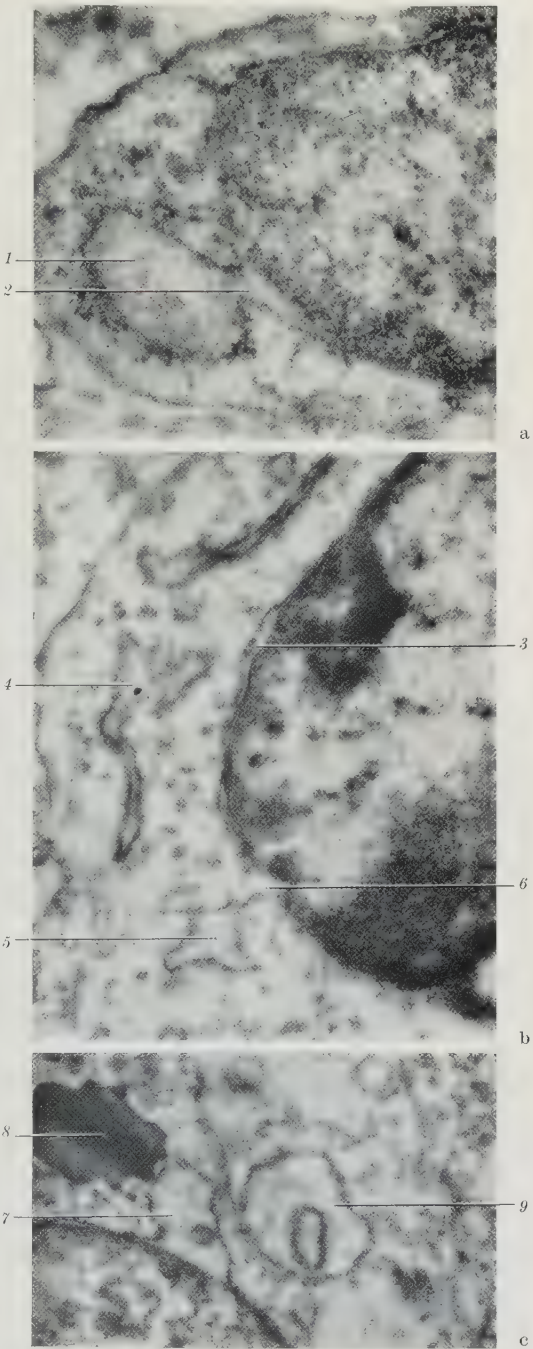


Abb. 15. Flache Zelle an der Grenze von Knorpel und präossalem Gewebe. 1 Zellkern mit randständigem Chromatin. 2 Schmäler perinukleärer Raum. 3 Erweiterung des perinukleären Raumes an den Kernenden. 4 Cytoplasma auf der Knorpelseite. 5 Cytoplasmaraum auf der Knochenseite. 6 Mitochondrium. 7 Osmiophile Einlagerung. 8 Knorpelsubstanz. 9 Kalkeinlagerungen des präossalen Gewebes. 10 Rand eines jungen Osteozyten. Vergr. 24 500

Fibrillen oder Fibrillengruppen werden vereinzelt mit Ablagerungen von nadelförmigen Kristallen umgeben.

Wir kamen zu der Auffassung, daß der Spaltraum um den schlauchförmigen Kern (Abb. 14) vermutlich durch eine Einbuchtung der Kernoberfläche zustande kommt. An das kopfartig aufgetriebene Ende des Kernes schließt sich ein Hohlraum an, dessen Natur vielleicht durch eine andere Beobachtung aufgeklärt werden kann (Abb. 15). In einer etwa 1μ breiten Zelle von geringer Länge fanden wir den Kern an der Längsseite noch von einem schmalen Cytoplasmasaum umgeben. Der Aufbau der an den Kern angrenzenden Cytoplasmahauben entspricht der obigen Beschreibung. An beiden Enden des Kernes dieser Zelle liegt ein größeres bläschenartiges, elektronenmikroskopisch leeres Gebilde. Aus dem Verlauf der Kernmembranen ist zu schließen, daß es sich bei diesen Bläschen um starke Erweiterungen des perinukleären Raumes handelt. Möglicherweise liegt eine Schrumpfung des Kernes einschließlich der inneren Kernmembran vor, während die äußere Kernmembran ihren ursprünglichen Umfang beibehält. Wir können nicht entscheiden, ob diese Schrumpfung ein Artefakt oder das Äquivalentbild einer Strukturänderung des Kernes *in vivo* ist. Vermutlich disponiert eine Zustandsänderung der Kernsubstanz (Auftreten niedermolekularer Stoffe?) zu einer Fixierungsschrumpfung.



16a—c. Erweiterungen des perinukleären Raumes in Chondroblasten und Chondrozyten. a Chondrozyt des Appositionsknorpels in Nähe der Zelle von Abb. 14: 1 Perinukleäre Blase, 2 Stiel der Blase. Vergr. 56 000. b Chondroblast: 3 Mäßige Erweiterung des perinukleären Raumes. 4 Endoplasmatisches Retikulum, 5 Verzweigte perinukleäre Ausstülpung, 6 Deren Stiel. Vergr. 25 000. c Chondroblast: 7 perinukleäre Blase mit einem bläschenartigen Einschuß, 8 Osmiophile Einlagerung, 9 Angeschchnittener Zellfuß. Vergr. 21 500

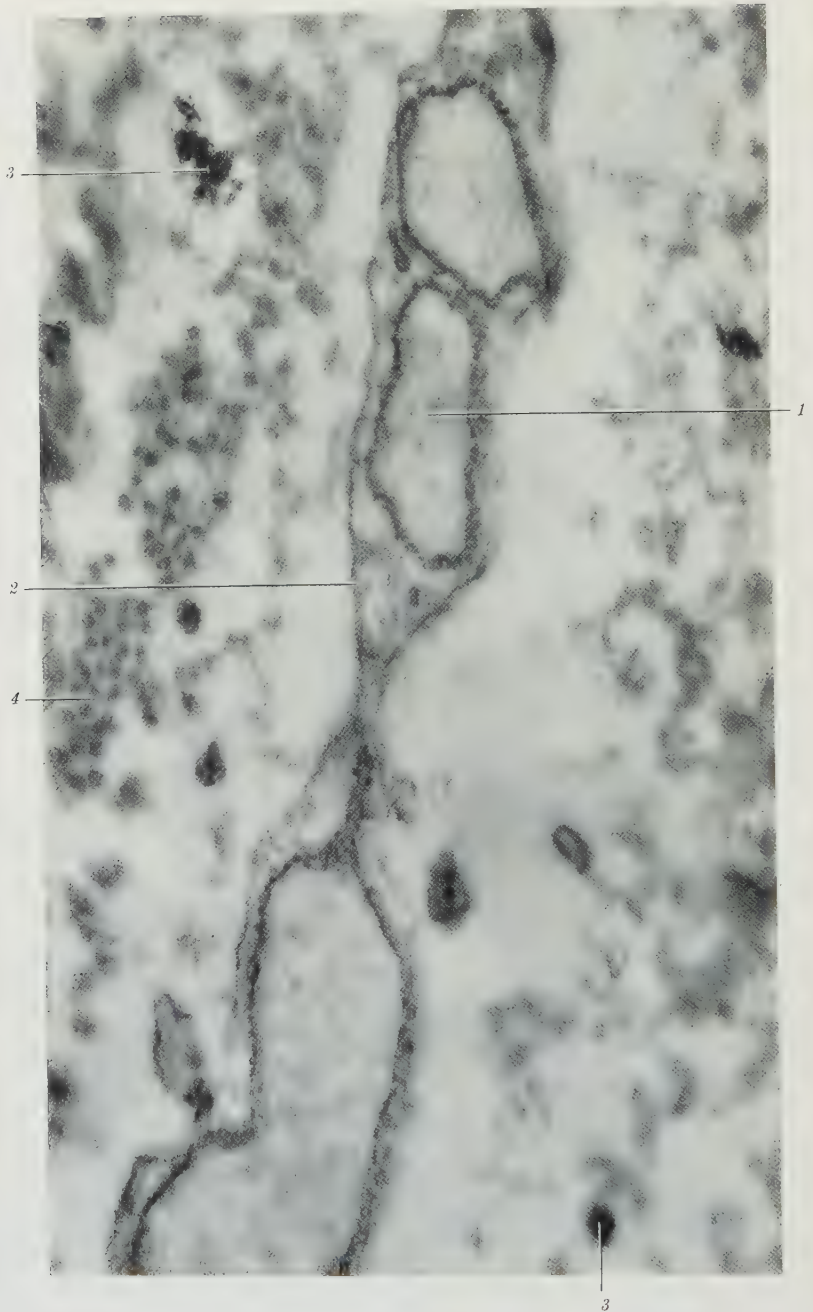


Abb. 17. Zellschatten im präossalen Gewebe. 1 Erweiterte Zisterne. 2 Zellmembran. 3 Kristallhaufen im präossalen Gewebe. 4 Fibrillenquerschnitte. Vergr. 57 000

Bei sehr vielen Kernen konnten wir örtlich begrenzte Vergrößerungen des *perinukleären Raumes* beobachten, wobei am restlichen Umfang des Kernes der *perinukleäre Raum* keine Verbreiterung zeigt. An Kernen von Zellen des

Vorknorpelblastems sowie des Vorknorpels sind wechselnde Erweiterungen des perinukleären Raumes häufig anzutreffen (vgl. KNESE und KNOOP 1961a). In unmittelbarer Nachbarschaft der oben beschriebenen flachen Zelle (Abb. 14) liegt z.B. ein Chondrozyt des Appositionsknorpel, dessen Kern eine blasenförmige Erweiterung und Ausstülpung des perinukleären Raumes erkennen läßt (Abb. 16a). Das Bläschen, das von der äußeren Kernmembran umhüllt wird, sitzt dem Kern mit einer stielartigen Einengung auf. In anderen Fällen besteht eine breite Verbindung zwischen dem abgehobenen Bläschen und dem restlichen perinukleären Raum (Abb. 16c). Mitunter besitzt eine solche Abschnürung einen Stiel und das Lumen gleicht einem verästelten Spaltraum (Abb. 16b). Weiterhin sahen wir in einem wenig erweiterten perinukleären Raum ein durch eine Membran umschlossenes Bläschen (Abb. 16c).

Die Cytoplasmastruktur der flachen Zellen an der Grenze vom Knorpelgewebe zum Periost ist ungewöhnlich wechselnd. Der Kern ist häufig an ein Zellende verlagert (Abb. 1, 15). An ihn schließen sich nicht selten größere Vakuolen und Mitochondrien an (Abb. 1, 14, 15). Das endoplasmatische Retikulum kann fehlen oder aus nur wenigen Membranpaaren bestehen; in diesem Falle sind die Zisternen stark erweitert (Abb. 17). Der Inhalt der Zisternen erscheint homogen, seine elektronenmikroskopische Dichte ist gering. Vermutlich sind einige der kernnahen Vakuolen auf solche Zisternen zurückzuführen. Mitunter sind in das präossale Gewebe Strukturen eingebettet, die man als Zellschatten bezeichnen möchte (Abb. 18), da Reste der Zellmembran, einige Mitochondrien und Cytoplasmagranula erhalten sind.

4. Lichtmikroskopische Befunde

Form und Verteilung der Zellen an der Grenze von Perichondrium zu Knorpel bzw. Periost zu Knochen sind bei Färbung mit Galloeyanin gut zu erkennen, da die Interzellulärsubstanz des Knorpels und Knochens den Farbstoff nicht aufnimmt (Abb. 19a). Bei Färbung mit Galloeyanin bleiben die Zelleiber der Chondroblasten ungefärbt (vgl. KNESE und KNOOP 1961a). Die Knochenbildungszellen am Ende der Diaphasenröhre zeigen eine leichte Grautönung ihres Cytoplasmas. Die Zellkörper der polar differenzierten Osteoblasten weisen eine kräftige, netzartig verteilte Schwärzung auf, die den Präosteoblasten noch fehlt. Nach Ribonucleaseeinwirkung erscheint dieses Cytoplasmanetz nur noch zart grau angefärbt.

Die Chondrocyten des Appositionsknorpels haben einen länglich-ovoiden Kern, dessen Längsachse in Längsachse des Skeletstückes verläuft (KNESE und KNOOP 1961a). Beiderseits des Kernes ist auch lichtmikroskopisch ein schmaler Cytoplasmaraum zu beobachten, der in die Cytoplasmahauben jenseits beider Kernpole übergeht. Die anliegenden Chondroblasten sind von plumper ovoider Gestalt. Diaphysenwärts folgen Chondroblasten mit schlankem Zellkörper. Bei Rinderfeten unter 100 mm SSL ist in der Lagerung dieser Zellen keine bestimmte Ordnung zu erkennen. Bei älteren Rinderfeten verläuft die Längsachse der Chondroblasten von peripher epiphysenwärts nach zentral zur Diaphyse hin. Der Interzellulärraum zwischen diesen schlanken Chondroblasten ist wesentlich breiter als in den epiphysennahen Abschnitten des Perichondriums; vielleicht beruht dies nur auf Schrumpfung. In Höhe der schlanken Chondroblasten werden die Chondrozyten des Appositionsknorpels schmaler und länger. Den Kern umrah-

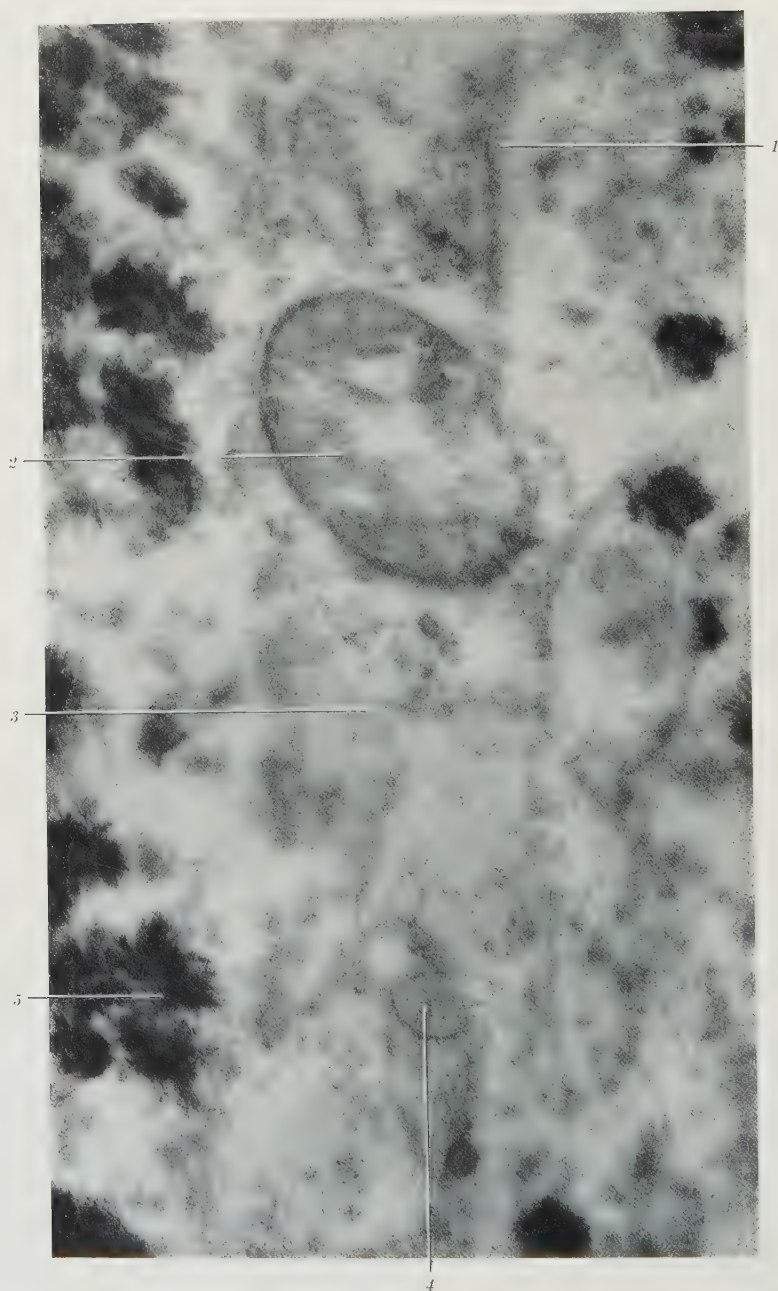


Abb. 18. Zellschatten im präossalen Gewebe. 1 Zellmembran. 2 Mitochondrium mit Cristae. 3 Reste des Grundplasmas unbekannter Natur. 4 Bläschenartige Gebilde. 5 Kalkeinlagerungen im präossalen Gewebe. Vergr. 56 000

mende Cytoplasmasäume sind nicht mehr sichtbar; nur noch die seitlich anschließenden Cytoplasmahauben bleiben klar erkennbar. Die Interzellulärsubstanz des Knorpels ist gering entwickelt, so daß eine relativ dichte Lagerung dieser

schmalen Chondrozyten zustande kommt. Die beschriebenen Formunterschiede der Zellen des Appositionsknorpels sind bei älteren Rinderfeten ausgeprägter als bei jüngeren.

Der Übergang vom Perichondrium zum Periost ist durch Fehlen der weiten Interzellularspalten gekennzeichnet. Während die reifen polaren Osteoblasten in der Diaphyse ein Pseudoepithel bilden, d.h. in einer geschlossenen Schicht liegen, treten die Knochenbildner am Ende der Diaphyse in der *encoche d'ossification* in Zellhaufen auf. Obwohl keine ausgesprochene Schichtung der Zellen vorliegt, kann die Breite dieses sog. periostalen Ringes mit etwa 5–7 Zellen gleicher Struktur und die Länge zu 15–30 Zellen angegeben werden. Die Zellen erinnern an epitheloide Elemente, da ihr Cytoplasma im Vergleich zum Kern relativ reichlich entwickelt ist und den Kern allseitig umgibt. Der Kern hat eine ovoide Gestalt. Das Cytoplasma färbt sich mit Galloeyanin schwach grau an.

Die dem periostalen Ring benachbarten Chondrozyten des Appositionsknorpels sind sehr schmal und haben einen langen stäbchenförmigen Kern. An der Längsseite des Kernes kann ein Cytoplasmasaum lichtmikroskopisch nicht mehr festgestellt werden. Die Struktur des Kernes ist infolge der kräftigen Anfärbung mit Galloeyanin nicht mehr klar erkennbar. Die Interzellularsubstanz zwischen den schmalen Appositionszellen ist sehr gering entwickelt.

In der diaphysenwärts gelegenen Hälfte der *encoche* und am Ende der Diaphysenschale liegen dem Skeletstück Zellen an, die etwas breiter als die Chondrozyten sind. Demgemäß ist ihr Kern ovoid gestaltet. Diese Zellen unterscheiden sich von den Chondrocyten der Appositionszone durch eine Anfärbbarkeit des Cytoplasmas mit Galloeyanin, die nach Vorbehandlung mit Ribonuclease fehlt. Eine deutliche Zellgrenze ist nicht immer feststellbar, so daß der Eindruck eines synzytialen Zellverbandes entsteht (vgl. PETERSEN 1919, „Osteoblastensynzytium“). An diese Zellschicht schließt sich eine dünne periostale Knochen- schale an. Mitunter folgt auf eine solche Zellage nach außen zu eine schmale Knochenschicht, die wiederum peripher von einer Lage ähnlich geformter Zellen bedeckt ist. Auf diese Weise kommt es zu einer Aneinanderfügung von Zell- und Knochenschichten, die dem oben beschriebenen elektronenmikroskopischen Bilde (Abb. 2) entspricht. Die mit Galloeyanin färbbaren Zellen sind demgemäß als Knochenbildner anzusprechen. Wir haben früher vorgeschlagen (KNESE 1956), die Bezeichnung Osteoblast nur den polar differenzierten Zellen der Diaphysenmitte vorzubehalten.

Die *encoche* oder der periostale Ring liegt in Höhe der Säulenknorpelzellen. Unterhalb der Knochenbildner befinden sich im Appositionsknorpel noch Chondrozyten der beschriebenen Gestalt. In Richtung der Markhöhle folgen Zellen mit einem lang ausgezogenen Kern, an dessen Enden schmale Cytoplasmahauben sitzen. Der Kern färbt sich mit Galloeyanin gleichmäßig dunkel. Die Menge der Interzellularsubstanz zwischen diesen Zellen ist sehr gering. Derartige flache Zellen des Appositionsgebietes sind bis über die Eröffnungszone hinaus auf der Markseite der Diaphysenschale anzutreffen.

An die *encoche* schließt sich die dünne Schale periostalen Knochens an, die das Ende der Diaphysenschale bildet. Dieser Knochen wird von einer einschichtigen Zelltapete von Knochenbildnern bedeckt; letztere sind von länglicher Gestalt und liegen mit ihrer Längsachse in Längsrichtung des Skeletstückes. Etwa in der

Höhe der Eröffnungszone des Knorpels nehmen die Zellen eine epitheloide Form mit polarer Differenzierung an, d. h. sie sitzen mit einem breiteren Fuß dem Kno-

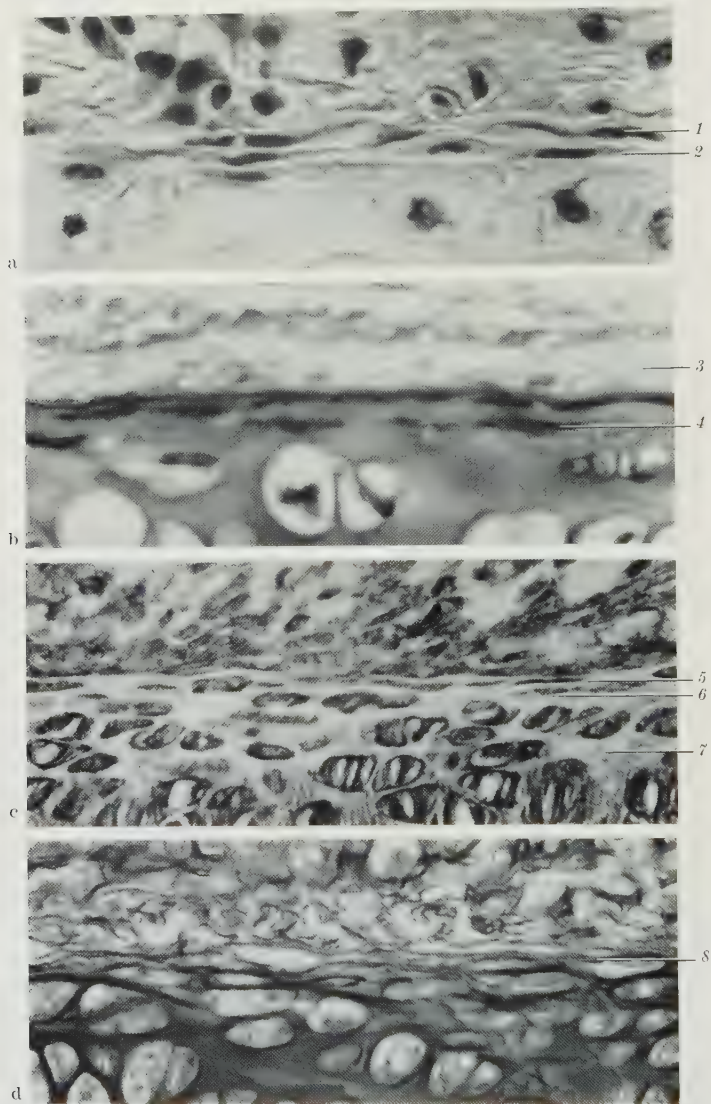


Abb. 19a—c. Flache Zellen bei verschiedenartiger Färbung. Rinderfet 126 mm (a, c, d) und 132 mm (b). a Galloeyanin: 1 Flache Zellen, deren Cytoplasma ebenfalls angefärbt ist. 2 Zelle ohne Cytoplasmafärbung. b Toluidinblau in wässriger Lösung pH 4,1: 3 Ungefärbte Knochenschicht. 4 Dunkelviolett gefärbte flache Zellen, eingebettet in hellrotviolette Interzellularsubstanz. c Polysaccharid-Eisen-Reaktion (GRAUMANN): 5 Flache Zelle mit gleichmäßig dunkler Anfärbung. 6 Zelle mit unterschiedlicher Kern- und Cytoplasmafärbung. 7 Ungefärbte Interzellularsubstanz. d Polysaccharid-Eisen-Reaktion (MÜLLER): 8 Dunkelblau tingierte Interzellularsubstanz, Zellen praktisch ungefärbt.

Obj. 40. OK. 12,5

chen auf, der Kern liegt in der dem Knochen abgewandten Hälfte der Zellen. Damit liegen jetzt polar differenzierte Osteoblasten vor. Ihr Cytoplasma besitzt ein mit Galloeyanin anfärbares Netzwerk.

Ein guter Überblick von Aufbau der Übergangszone zwischen Perichondrium und Periost ist durch Färbung mit der Polysaccharid-Eisen-Reaktion (GRAUMANN 1958) zu gewinnen (Abb. 19c), da die Interzellulärsubstanz des Appositionsknorpels ungefärbt bleibt. Das Cytoplasma der schmalen Zellen der Appositionszone ist dunkelblau gefärbt und setzt sich deutlich gegen den rötlich tingierten Kern ab. Die Anfärbung des Zelleibes der flachen Zellen in Höhe der encoche ist mitunter so stark, daß der Zellkern nicht mehr zu sehen ist.

Im Bereich des hyalinen Epiphysenknorpels ist das Perichondrium locker strukturiert. Etwa vom Proliferationsknorpel ab ist eine zarte Anfärbung des Cytoplasmas der Perichondriumzellen mit Berliner Blau festzustellen. Die Perikaryen der encoche-Zellen werden dagegen schwächer angefärbt. Die flachen Knochenbildungszellen, deren Bild nach Anfärbung mit Gallocyanin oben geschildert wurde, sind nach der Polysaccharid-Eisen-Reaktion nicht als gesonderte Zellformen auszumachen. Das Cytoplasma der polar gebauten Osteoblasten nimmt eine kaum merkbare Blaufärbung an. Der periostale Knochen bleibt ungefärbt.

Die Eisenreaktion von MÜLLER (1959) nach Blockierung der Proteine durch Ninhydrin gibt im Hinblick auf die Färbung des Appositionsknorpels und der Zellen ähnliche Ergebnisse wie die Reaktion von GRAUMANN. In der encoche und im anschließenden Periost überwiegt die Blaureaktion der Interzellulärsubstanz. Auch die oberflächliche Schicht des periostalen Knochens wird angefärbt. Die Osteoblasten bleiben farblos. In Diaphysenmitte wird die zwischen den Osteoblasten liegende Interzellulärsubstanz blau getönt.

Die Modifikation der Hale-Färbung nach MÜLLER (1955/56) stellt fast ausschließlich Interzellulärsubstanzen dar (Abb. 19d). Im Periost ist ein feines Netzwerk auszumachen, das vermutlich aus Kollagenfibrillen besteht. Es ist anzunehmen, daß auch die Färbung der encoche in der Hauptsache auf einer Anfärbung der Fibrillen beruht.

Bei Färbung mit alkoholischer Toluidinblaulösung fallen bei Feten unter 100 mm SSL die Zellen des periostalen Ringes durch ihre metachromatische Anfärbung auf. Nach Hyaluronidaseeinwirkung ist diese Cytoplasmametachromasie verschwunden. Es tritt eine kräftige Anfärbung der Interzellulärsubstanz des Appositionsknorpels auf. Die Osteoblasten sind so dunkel gefärbt, daß nicht zu entscheiden ist, ob eine orthochromatische oder metachromatische Reaktion bzw. beide vorliegen (s. unten). Bei Feten über 100 mm SSL ist die metachromatische Färbung der encoche-Zellen und des anschließenden periostalen Knochens sehr kräftig. Die Zellmetachromasie verschwindet nach Hyaluronidase-Vorbehandlung, die des Knochens nach Ribonucleaseeinwirkung. Die Masse des periostalen Knochens in der Diaphysenmitte reagiert orthochromatisch, wobei sowohl an der Periost- als auch an der Markseite ein metachromatischer Streifen hinzutritt. Die Appositionszone und die flachen Zellen unter der periostalen Schale in Höhe des Säulen- und hypertropen Knorpels werden mit alkoholischer Toluidinblaulösung kräftig blauviolett gefärbt. Die Reaktion ist nach enzymatischer Vorbehandlung mit Hyaluronidase und Ribonuclease nur wenig schwächer.

Weitere Aufklärung über die metachromatische Reaktion der Bildungszonen sind bei Verwendung wäßriger Toluidinblaulösungen in verschiedenen pH zu erhalten (vgl. KNESE und KNOOP 1961a). Das Cytoplasma der Chondroblasten reagiert bei einem pH von 3,6 noch nicht, bei 4,1 schwach metachromatisch. Die Zellen des periostalen Ringes zeigen bei Feten unter 100 mm SSL im pH 3,6 eine Cytoplasmametachromasie, die nach vorheriger Einwirkung von Hyaluronidase fehlt, von Ribonuclease schwächer ist. Das Cytoplasma der zentral in der encoche

gelegenen Knochenbildner reagiert orthochromatisch. Die flachen Zellen des Appositionsknorpels sind stark metachromatisch tingiert.

Auf dem mit Toluidinblau metachromatisch reagierenden periostalen Knochen liegen Knochenbildner von flacher Gestalt. Diese Zellen enthalten eine netzartige metachromatisch anfärbte Cytoplasmastruktur. Das Cytoplasma der polar gebauten epitheloiden Osteoblasten der Diaphysenmitte zeigt demgegenüber nach Toluidinblaufärbung besonders im pH 4,1 eine orthochromatisch gefärbte Netzstruktur (vgl. Abb. 20 b).

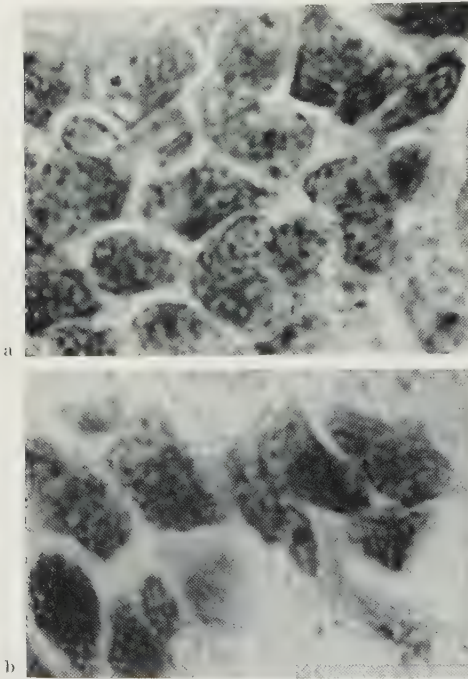


Abb. 20 a u. b. Polar differenzierte Osteoblasten. Rinderfet (126 mm SSL). a Toluidinblau wäßrige Lösung pH 4,1; dunkelblauvioletttes Netz z.T. in der Form von dichteren Körnchen, Netzmaschen hellrotviolett. b Methyleneblau pH 4,1; dunkelblaues Cytoplasmanetz. Ölimmersion 100. Ok. 12,5

Die Netzmaschen reagieren metachromatisch. Nach Ribonucleaseeinwirkung und Toluidinblaufärbung im pH 4,1 erscheinen die polar gebauten Osteoblasten schwach orthochromatisch angefärbt, die peripheren Zellen der encoche reagieren stärker metachromatisch als die zentralen, und das Cytoplasma der flachen Knochenbildner am Ende der Diaphyse bleibt ungefärbt. Durch Vorbehandlung mit Hyaluronidase wird die Metachromasie aller genannten Zellen herabgesetzt, verschwindet aber nicht vollständig.

Bei Rinderfeten über 100 mm SSL färbt sich das Cytoplasma der Zellen im periostalen Ring mit Toluidinblau im pH 3,6 stark metachromatisch. Diese Reaktionsform zeigen etwas schwächer auch die unmittelbar anschließenden Chondroblasten und die flachen Knochenbildner am Diaphysenende. Das Knochengewebe am Ende der Diaphysenröhre in Höhe der Eröffnungszone ist metachromatisch angefärbt (siehe unten). Die Zellen der angrenzenden Appositionszone des Knorpels und die

flachen Zellen unter der Diaphysenschale erscheinen blauviolett tingiert (Abb. 19 b). Die polaren Osteoblasten der Diaphysenmitte reagieren orthochromatisch. Nach Hyaluronidaseeinwirkung nimmt die Metachromasie der encoche-Zellen ab. Alle anderen Zellen des Perichondriums und Periostes zeigen nur eine geringe Änderung ihrer Färbbarkeit. Durch Vorbehandlung mit Ribonuclease wird die metachromatische Reaktion der encoche-Zellen wenig verändert. Die anschließenden flachen Knochenbildner weisen eine schwach orthochromatische Cytoplasmanfärbung auf, die bei dem Übergang zu den polaren Osteoblasten der Diaphysenmitte schrittweise schwindet.

Bei Toluidinblaufärbung im pH 4,1 ist die Cytoplasmametachromasie aller Zellen verstärkt. Auch die Zellen des Perichondriums in Diaphysennähe reagieren nun mehr metachromatisch, ebenso die flachen Knochenbildner am Diaphysen-

ende. Die Zelleiber der polar gebauten Osteoblasten der Diaphysenmitte besitzen ein dunkel blauviolett tingiertes Netz (Abb. 20 a). In den Netzlücken tritt eine helle rotviolette metachromatische Reaktion auf. Durch Hyaluronidasevorbehandlung geht die Cytoplasmametachromasie der mittleren encoche-Zellen verloren; sie wird in den anderen Zellen verschieden stark abgeschwächt. Die Osteoblasten besonders in Diaphysenmitte reagieren nunmehr orthochromatisch. Sehr deutlich tritt die periostale Grundschrift nach Hyaluronidasebehandlung hervor, d.h. eine Knochenlamelle, die vom Diaphysenende bis in die Höhe der Eröffnungszone reicht. Diese Grundschrift wird auf der Periostseite von ungefärbtem Knochengewebe bedeckt. Die darunter gelegene Interzellulärsubstanz des Appositionsknorpels hat nach Hyaluronidaseeinwirkung an Färbungsintensität abgenommen, so daß die in ihrer Anfärbung unveränderten Chondrozyten bzw. flachen Zellen klar hervortreten. Nach Ribonucleaseeinwirkung bleibt die Metachromasie der periostalen Grundschrift ebenfalls erhalten. Die polar gebauten Osteoblasten weisen nach Ribonucleasedigestion nur noch eine Kernfärbung auf. Die metachromatische Reaktion der encoche-Zellen und der anschließenden flachen Knochenbildner ist kaum verändert.

Färbung mit Bestschem Karmin führt zu einer schwachen homogenen Rotfärbung des Cytoplasmas der Präosteoblasten bei Feten über 100 mm SSL, nicht aber der Osteoblasten und der encoche-Zellen. Die Präosteoblasten von Feten unter 100 mm SSL enthalten einige karmingefärbte Granula.

Durch PAS-Färbung sind in den Präosteoblasten von Feten unter 100 mm SSL zur Diaphysenmitte hin wesentlich vermehrt Granula darzustellen, die nach Diastaseeinwirkung verschwinden. Nach der BTS-Färbung erscheint die Anzahl der Granula in den Präosteoblasten vermehrt. Auch in den reifen Osteoblasten der Diaphysenmitte treten Granula auf. Die Körnchen beider Zellarten sind durch Diastasevorbehandlung zu hydrolysieren.

Die Verteilung PAS-positiver Granula in den Periostzellen von Feten über 100 mm SSL ist derjenigen bei Rinderfeten unter 100 mm SSL recht ähnlich. Allerdings fielen uns von Tier zu Tier größere Unterschiede auf, so daß an wechselnde Funktionszustände der Periostzellen gedacht werden kann. Im allgemeinen ist bei Rinderfeten von mehr als 100 mm SSL die Anzahl der Granula in den Präosteoblasten größer, ihr Durchmesser aber kleiner; in den Osteoblasten ist die Zahl kleiner, das einzelne Granulum aber größer. Die Zellschicht in unmittelbarer Nachbarschaft der ausdifferenzierten Osteoblasten besitzt sehr wenig PAS-positive Granula. Die Menge der Körnchen nimmt zur Diaphysenmitte hin zu; sie fehlen in der encoche und sind in den anschließenden flachen Knochenbildnern selten. Mitunter sahen wir aber auch die Osteoblasten von einer größeren Zahl von Granula erfüllt, wobei sich Unterschiede von Zelle zu Zelle ergaben. Einmal beobachteten wir starke Granulanhäufungen in periostalen Osteoblasten, die etwa in Höhe der Eröffnungszone liegen. Hinzugefügt sei, daß die Markosteoblasten stärker mit Granula beladen sind. Die periostale Grundschrift reagiert PAS-positiv.

Zellen mit BTS-positiven Granula sind bei Feten über 100 mm SSL noch über der encoche und in der Schicht unmittelbar vor den ausdifferenzierten Osteoblasten, z.T. auch in den Osteoblasten selbst nachzuweisen. Der Bereich der BTS-positiven Granula ist damit etwas größer als das Areal mit PAS-positiven Granula. Die BTS-positiven Granula nehmen ebenfalls zu den Osteoblasten hin an Größe zu, an Zahl aber ab.

Nach Färbung mit gepuffertem Methylenblau ist die Cytoplasmafärbung der Chondroblasten von Feten unter 100 mm SSL bei einem p_H von 3,2 gering, die der encoche-Zellen wenig stärker, jene der flachen Knochenbildner und polaren Osteoblasten kräftig. Bei Hyaluronidaseeinwirkung nimmt die Anfärbung der Chondroblasten ab; die Zellen der encoche erscheinen fast ungefärbt, die Osteoblastenfärbung ist kaum verändert. Nach Ribonucleasebehandlung sind die Osteoblasten stark, die Chondroblasten wenig abgebläßt. Die Anfärbung der

Zellen in der encoche ist nur wenig verändert. Ähnliche Feststellungen sind, z. T. deutlicher, bei den folgenden pH -Stufen zu machen. Die flachen Knochenbildungszellen in der zentralen Hälfte der encoche sind nach Methylenblaufärbung im pH 4,1 und 4,7 nach Hyaluronidaseeinwirkung infolge ihrer Cytoplasmametachromasie gut zu erkennen, da die Interzellulärsubstanz ungefärbt bleibt.

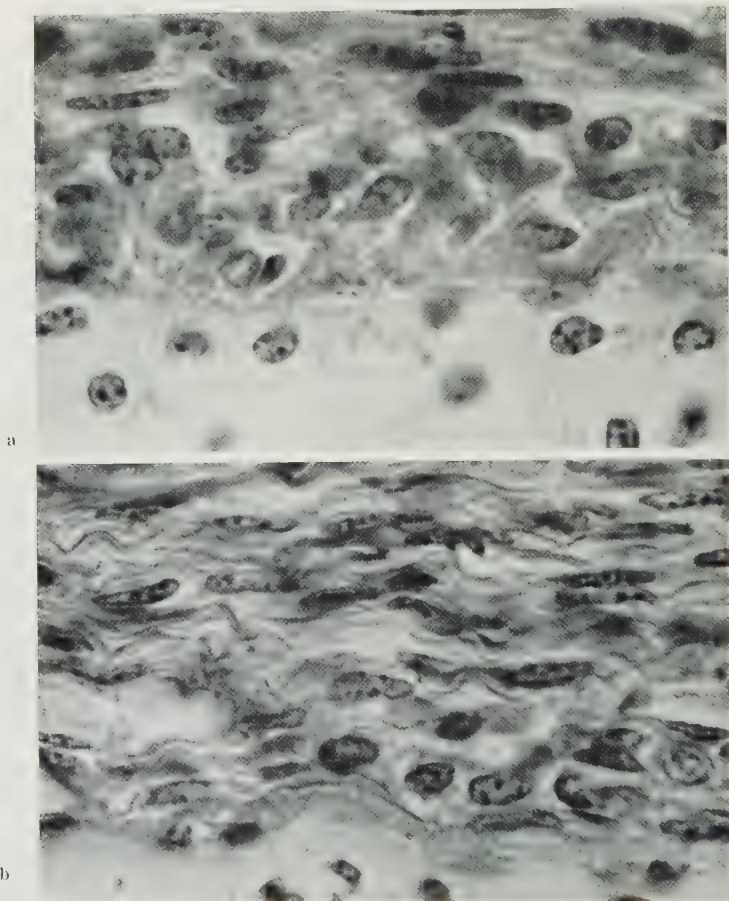


Abb. 21a u. b. Perichondrium. Rinderfet (105 mm SSL). a Methylenblau pH 4,7. b Hyaluronidase Methylenblau pH 4,7: Fibrillenwerk des Perichondriums und des peripheren Appositionsknorpels gut kenntlich. Ölimmersion 100. Ok. 12,5

Bei Fetten über 100 mm SSL ist nach Methylenblau im pH 3,2 nur eine schwache Blaufärbung des Cytoplasmas der encoche-Zellen zu beobachten; im pH 3,6 ist die Anfärbung stärker. Die diaphysenwärts anschließenden Knochenbildungszellen sind nun ebenfalls blau tingiert und zwar intensiver als die Zellen der encoche. Bei Methylenblaufärbung im pH 4,1 reagiert das Cytoplasma der diaphysennahen Chondroblasten und das der encoche-Zellen stark metachromatisch. Die Appositionszone des Knorpels stellt sich als ein dunkelvioletter Streifen dar. Zwischen ihm und der encoche fallen einige Zellen durch besonders starke Cytoplasmafärbung auf, die flachen Knochenbildungszellen. Die der encoche benachbarten Knochenbildungszellen auf der periostalen Schale zeigen ebenfalls ein

metachromatisch reagierendes Cytoplasma. Nach Ablagerung von metachromatisch tingiertem periostalem Knochen besitzen die Osteoblasten ein kräftig orthochromatisch gefärbtes, netzartig strukturiertes Cytoplasma (Abb. 20 b). Der Inhalt der Netzmaschen zeigt bei Methylenblaufärbung häufig eine schwache

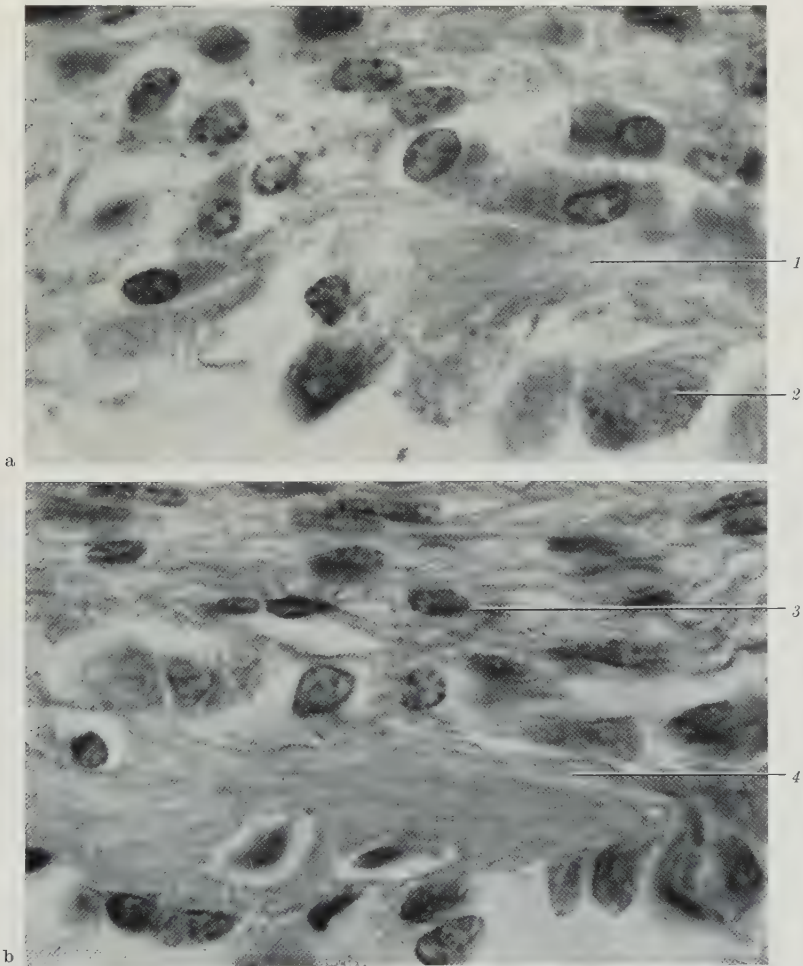


Abb. 22 a u. b. Periost und Knochenbälkchen. Rinderfet (105 mm SSL). a Methylenblau $pH\ 4,7$: 1 Knochenbälkchen. 2 Polarer Osteoblast mit Cytoplasmnetz. b Hyaluronidase Methylenblau $pH\ 4,7$: 3 Präosteoblast in das Fibrillenwerk des Periosts eingebettet. 4 Präossaler Saum des Knochenbälkchens mit Fibrillen. Ölimmersion 100. Ok. 12,5

hellrote Metachromasie. Dieses Netzwerk läßt sich auch mit Galloeyanin und Toluidinblau in wäßriger Lösung darstellen. Ähnlich, aber schwächer sind die polaren Osteoblasten der Diaphyse gefärbt. Die tiefen Schichten des periostalen Knochens reagieren orthochromatisch.

Durch Hyaluronidaseeinwirkung vor der Methylenblaufärbung ($pH\ 4,1$) wird die Anfärbbarkeit der encoche-Zellen und der benachbarten flachen Knochenbildungszellen auf der Diaphysenschale herabgesetzt. Auch die schmalen Zellen des Appositionsknorpels sind schwächer gefärbt. Der periostale Knochen nimmt

keinen Farbstoff auf. Die Färbung der polaren Osteoblasten in der Diaphysenmitte ist unverändert, ihre Netzstruktur sehr deutlich. Nach Ribonucleasevorbehandlung ist das Cytoplasma der polaren Osteoblasten farblos. Die Zellen im periostalen Ring und die anschließenden flachen Knochenbildner reagieren orthochromatisch, ebenso die Chondrozyten der Appositionszone.

Ein besonderer Hinweis gebührt der Hyaluronidasewirkung auf die Interzellularsubstanz (Abb. 21), welche die fibrilläre Struktur sowohl im Perichondrium als auch im Periost deutlicher als ohne Fermenteinwirkung hervortreten läßt. Dies gilt aber auch für die Interzellularsubstanz des Appositionsknorpels und die Ränder der Knochenbälkchen (Abb. 22). Die Breite dieser aufgelockerten Trabekelränder entspricht etwa derjenigen der nach Toluidinblaufärbung zu beobachtenden metachromatischen Säume.

KNESE (1956, 1957) hat berichtet, daß bereits bei relativ frühen Stadien menschlicher Feten im polarisierten Licht lamellenartige Strukturen zu beobachten sind. Im Zusammenhang mit den elektronenmikroskopischen Erhebungen haben wir erneut an Rinderfeten Untersuchungen im polarisierten Licht durchgeführt und ihre Ergebnisse mit phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen verglichen.

Die sog. periostale Grundschrift weist eine starke Doppelbrechung auf (Abb. 23). Am Ende der Diaphysenschale ist — besonders eindrucksvoll bei etwas größeren, aber auch bei jüngeren Rinderfeten —, sowohl im Längsschnitt (Abb. 23) als auch im Querschnitt (Abb. 24) ein Wechsel von doppelbrechenden und nicht doppelbrechenden Schichten zu beobachten. Die Doppelbrechung des Knochengewebes ist stärker als jene der Fibroelastica. Der Wechsel von doppelbrechenden und nichtdoppelbrechenden Schichten in verschiedener Schnitttrichtung spricht für das Vorliegen einer lamellären Ordnung der Kollagenfibrillen und zwar im Sinne einer mehr steilen und einer mehr flachen Verlaufsrichtung im Hinblick auf das Skeletelement.

Bei jüngeren Feten in Diaphysenmitte, bei älteren in geringerem Abstand vom Diaphysenende (vgl. KNESE 1956, BÄHLING 1958) werden auf die erste periostale Knochenlamelle radiäre Bälkchen aufgebaut. Tangential oder zirkulär orientierte Trabekel verbinden die Spitzen dieser radiären Zapfen. Auf diesem



Abb. 23a u. b. Ende der Diaphysenschale im Längsschnitt. Rinderfet (190 mm SSL). a Mit Phasenkontrastverfahren, b in polarisiertem Licht. 1 Hypertrophe Knorpelzellen. 2 Eröffnungszone. 3 Chondraler Knochen. 4 Periostale Knochenlamelle mit lamellärer Schichtung. Obj. 10. Ok. 12,5

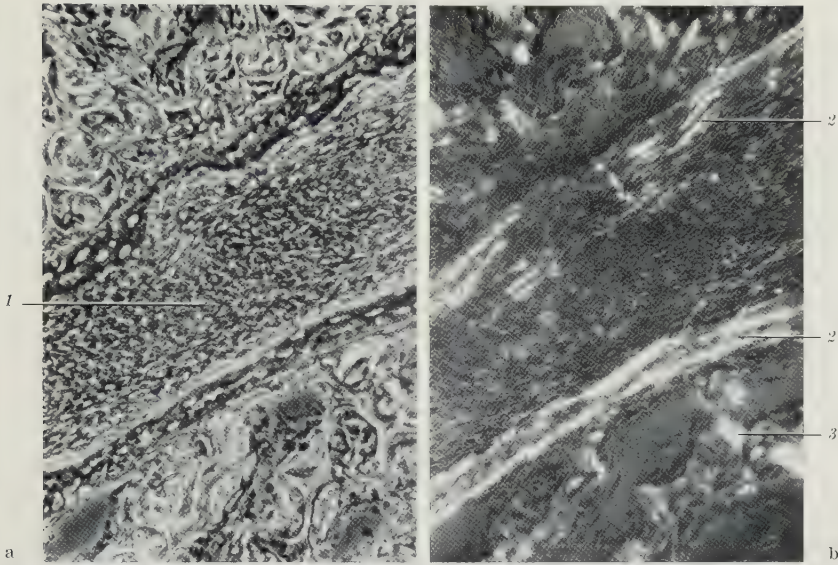


Abb. 24 a u. b. Metacarpus im Querschnitt. Rinderfet (113 mm SSL). a Mit Phasenkontrastverfahren, b in polarisiertem Licht. 1 Periostale Zwischenschicht zwischen Metacarpus 3 und 4. 2 Periostaler Knochen mit lamellärer Schichtung. 3 Chondraler Knochen mit Lamellen. Obj. 10. Ok. 12,5

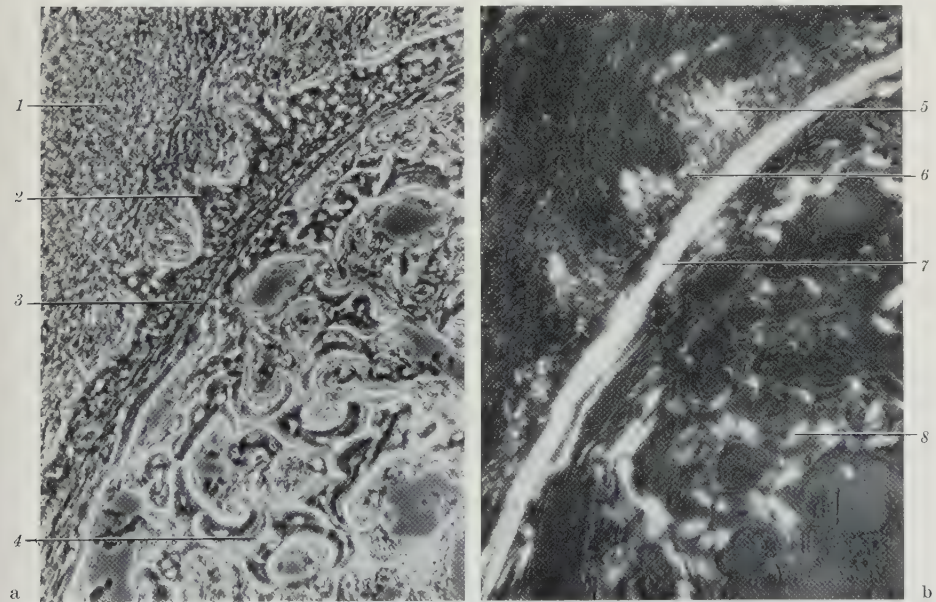


Abb. 25 a u. b. Metacarpus im Querschnitt. Rinderfet (190 mm SSL). a Mit Phasenkontrastverfahren, b in polarisiertem Licht. 1 Periost. 2 Radiäre Bälkchen. 3 Peri-enchondrale Grenzschicht. 4 Chondraler Knochen mit Knorpelresten. 5 Radiäre Lamellen der Bälkchenanlage. 6 Umbiegen der Lamellen in eine zirkuläre Verlaufweise. 7 Periostaler Knochen mit z.T. kenntlicher Schichtung. 8 Chondraler Knochen mit Lamellen. Obj. 10. Ok. 12,5

Wege werden Gefäße, umgeben von einer geringen Menge periostalen Gewebes, von Knochen eingeschlossen. In der Mitte der radiären Zapfen sind im polarisierten Licht annähernd radiäre Faserbündel oder besser wohl Faserschichten

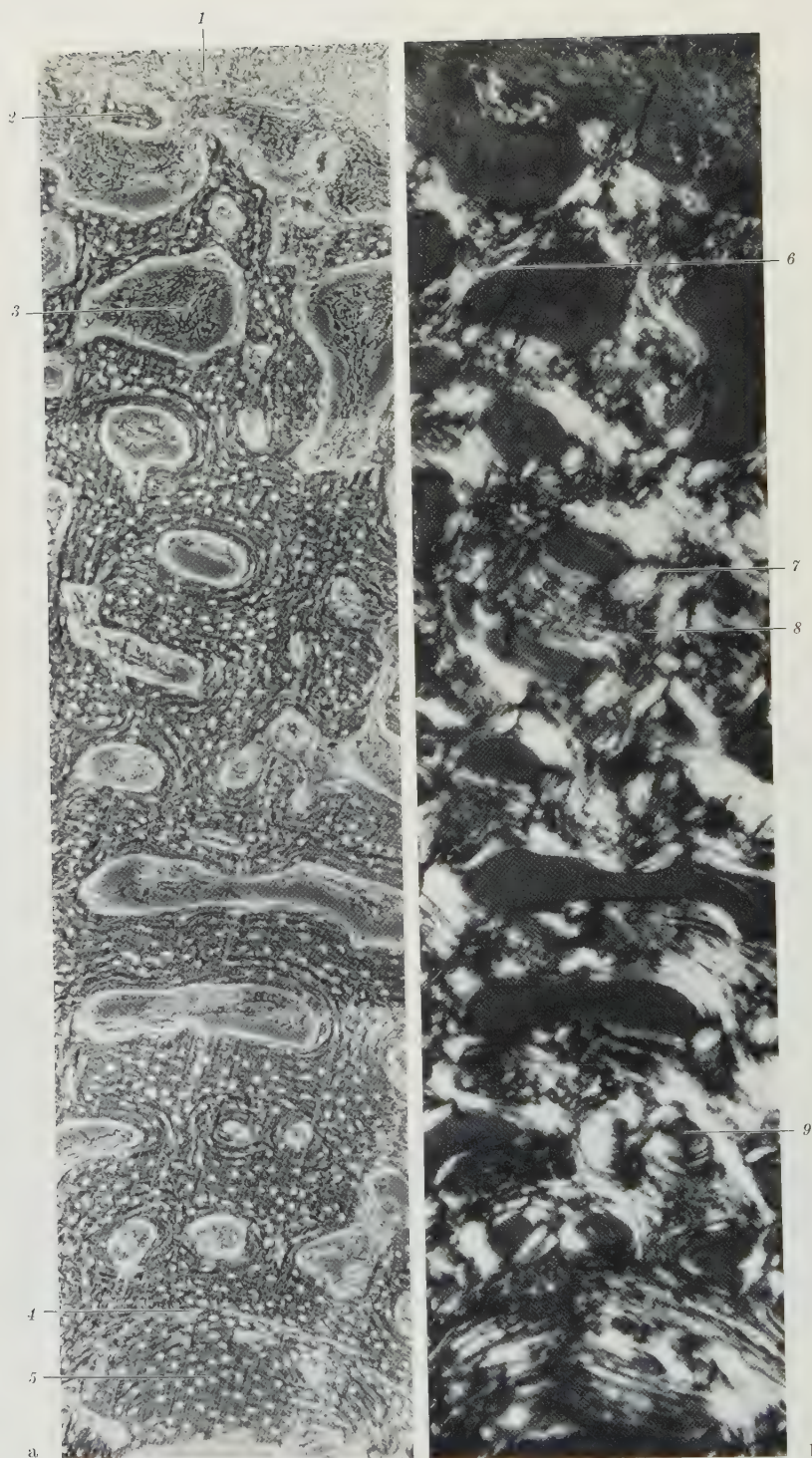


Abb. 26 a u. b. Querschnitt durch die Diaphyse des Metacarpus. Rinderföt (380 mm SSL). a Mit Phasenkontrastverfahren, b in polarisiertem Licht. 1 Periost. 2 Bälkchenanlage. 3 Weite intertrabekuläre Hohlräume. 4 Peri-enchondrale Grenzlinie. 5 Chondraler Knochen. 6 Lamellenanlage um intertrabekuläre Spalten. 7 Lamelläre Umhüllung von Gefäßräumen. 8 sog. Zwischengewebe. 9 Osteone zwischen deren lamellärer Wand nur geringe Reste von Zwischengewebe vorhanden sind. Obj. 10. Ok. 12,5. Photomontage

(s. Diskussion) zu beobachten. Am Fuß dieser Zapfen biegen die Faserschichten in eine zirkuläre Verlaufsrichtung um (Abb. 25). Die Anlage der die Gefäßräume abschließenden zirkulären Balken läßt bereits zirkuläre Faserschichten erkennen.

Sobald die zirkulär gerichteten Trabekel eine gewisse Länge und Dicke erreicht haben, liegen abgeschlossene Gefäßräume vor. Ihre Wand ist mehr oder minder deutlich von konzentrisch verlaufenden Lamellen geringer Dicke ($2-4\ \mu$) umgeben (Abb. 26). Die Wände zweier benachbarter Lamellensysteme werden von einer schmalen Schicht Zwischengewebe mit nicht ohne weiteres erkennbarer Fibrillenordnung voneinander getrennt. Bei dem weiteren Aufbau eines Bälkchensystems und damit einer dicken periostalen Knochenschicht wird die Lamellenumhüllung der Gefäßräume noch deutlicher (Abb. 26). Die zentralen, dem Markraum nahen Gefäßräume sind enger und haben eine dickere lamelläre Wand als die peripheren. In der Nähe der Markhöhle liegt ein kompakter Knochen mit etwa rundlichen Gefäßkanälen vor. Zum Periost hin geht die Kompakta allmählich in ein Bälkchenwerk mit weiten intertrabekulären Spalten über (vgl. BÄHLING 1958). Damit besteht ein klares Gefälle in der Ausbildung der Strukturen vom Mark zum Periost hin.

Beim Vergleich zwischen benachbartem periostalem und chondralem Knochengewebe (Abb. 25, 26) fällt auf, daß im chondralen Knochen die Ausdifferenzierung der Lamellen weiter vorangeschritten ist und die Lamellen dicker sind und zwar eine Stärke von etwa $4-7\ \mu$ erreichen. Frühere Erhebungen über den unterschiedlichen Ablauf der Lamellenausbildung beim Menschen (KNESE 1957) finden damit eine Bestätigung. Wie die Vergleichsaufnahmen mit dem Phasenkontrastmikroskop erkennen lassen, erfolgt die Lamellenausbildung bei noch bestehenden Knorpelresten.

IV. Diskussion

1. Struktur der skeletogenen Zellen

Ein Vergleich zwischen Knorpel- und Knochenbildung bei einer Spezies wurde, soweit uns bekannt, bisher nur von FELL (1925) für das Hühnchen und von PRITCHARD (1952) für die Ratte durchgeführt. Beide Autoren beschreiben die Form der Chondroblasten und Osteoblasten. PRITCHARD schildert außerdem das Verhalten beider Zellformen gegenüber histochemischen Färbemethoden. Jedoch wird in diesen Arbeiten nicht diskutiert, auf welchen Unterschieden in dem Ablauf der Bildungsvorgänge die differente Struktur von Knorpel- und Knochengewebe beruht.

Beide Bildungsvorgänge werden durch eine Reihe von Prozessen vorbereitet, von denen die Umwandlung von Stammzellen in Prächondroblasten und Chondroblasten bzw. in Präosteoblasten und Osteoblasten am besten bekannt ist. Chondrogenese und Osteogenese selbst spielen sich dann in einer Zone von weniger als $1\ \mu$ Dicke ab (KNESE und KNOOP 1958). Die Struktur dieser Bildungszonen konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen teilweise aufgeklärt werden. Erst auf Grund der Kenntnis dieser prächondralen bzw. präossalen Zone ist eine Erörterung darüber möglich, in welcher Form der Ablauf der Bildungsvorgänge die unterschiedliche Struktur beider Gewebe bedingt. In diesem Zusammenhang spielt die umstrittene Frage, ob eine besondere Spezifität der skeletogenen Zellen vorliegt, keine Rolle, da allein der Ablauf der Bildungsvorgänge in situ zur Diskussion steht.

Der Vergleich zwischen Knorpel- und Knochenbildung hat die *Art der Zell-tätigkeit*, den Ort der Faserbildung und die Synthese der organischen Interfibrillärsubstanz zu berücksichtigen. Die Tätigkeitsform der Bildungszellen im Bereich des Stützgewebes wurde auf Grund lichtmikroskopischer (STUDNIČKA 1907, WEIDENREICH 1923 b, PETERSEN 1935, KNESE 1956), histochemischer (PRITCHARD 1952, 1956), autoradiographischer (GREULICH und LEBLOND 1953, BÉLANGER 1954, 1956, AMPRINO 1955, 1956) und elektronenmikroskopischer (JACKSON und SMITH 1955, SHELDON und ROBINSON 1957, KNESE und KNOOP 1958, 1961 a) Untersuchungen mit der von Drüsenzellen verglichen. Als Begründung für diese Auffassung wurde angegeben, daß extrazelluläre Substanzen gebildet werden (BÉLANGER 1954 b, 1956 b, AMPRINO 1956, KNESE und KNOOP 1958) und die Morphologie der Bildungszellen derjenigen von Drüsenzellen, voran den Pankreaszellen vergleichbar ist (SHELDON und ROBINSON 1957). Die Eiweißumsatzrate von kubischen Osteoblasten und Pankreaszellen je Gramm Gewebe ist nach KOBURG (1961) gleich groß.

Die Stoffproduktion, sei es die Bildung eines Sekretes oder extrazellulärer Substanzen, ist an bestimmte Zellstrukturen gebunden. Im Hinblick auf die Zellstrukturen liegt eine große Ähnlichkeit zwischen Drüsenzellen und Bildungszellen der Skeletgewebe vor. Die sekretorische Tätigkeit der Drüsenzellen findet in einem endgültig ausdifferenzierten Organverband statt; das Sekret wird aus dem Organ abgeführt. Die Sekretion der Drüsenzellen ist demgemäß eine Tätigkeitsform, die auf den Gewebe- bzw. Organzustand keinen umgestaltenden, differenzierenden Einfluß besitzt. Bei den Stützgeweben werden die von den Zellen gebildeten Stoffe zu einer extrazellulären Komponente des Gewebes: Die Stoffproduktion ist ein entscheidender Anteil der Strukturbildung und Gewebedifferenzierung. Ein Vergleich zwischen Drüsenzellen und skeletogenen Zellen ist demzufolge *nur im Hinblick auf die Struktur der Zellen*, aber nicht mit Rücksicht auf die gebildeten Stoffe berechtigt.

Die Bildung extrazellulärer Substanzen als bleibender und die Struktur bestimmender Gewebekomponenten erschwert die Beurteilung der Beziehungen der Bildungszellen zu ihrer Umgebung im elektronenmikroskopischen Bilde. Das Auftreten neuer Strukturelemente verändert das Gefüge der fraglichen Zonen häufig so stark, daß die Entscheidung, ob ein präparatives Artefakt oder das Äquivalentbild einer Strukturänderung in vivo vorliegt, mitunter nicht leicht ist.

Die morphologische Ähnlichkeit zwischen Drüsenzellen und skeletogenen Zellen besteht in der starken Entwicklung des *Ergastoplasmas*. In den Osteoblasten (JACKSON 1954, SCOTT und PEASE 1956, SHELDON und ROBINSON 1957, KNESE und KNOOP 1958, ASCENZI und BENEDETTI 1959) und den flachen Knochenbildungszellen am Ende der Diaphyse ist stets eine Fülle von Doppelmembranen anzutreffen, die mit Ribosomen besetzt sind. Das Grundplasma ist auf schmale Straßen beschränkt. Das endoplasmatische Retikulum ist in Chondroblasten geringer ausgeprägt; es kann auch fehlen, so daß Chondroblasten nur von isolierten Ribosomen erfüllt sind (KNESE und KNOOP 1961 a).

Nach der Zielsetzung unserer Arbeit konnten wir die differente Ausbildung des *endoplasmatischen Retikulums* und seine unterschiedliche Gestalt in benachbarten Zellen nur feststellen. Jedoch wollen wir auf einige Beobachtungen hinweisen, die mit Angaben der Literatur über die Bildung des Ergastoplasmas überein-

stimmen. Über Abkunft und Entstehung des endoplasmatischen Retikulums werden bekanntlich sehr verschiedene Ansichten geäußert (HAGUENAU 1958). Mitunter werden bläschenartige Ausstülpungen der Kernmembran als Ursprungsgebilde der Membranpaare angesehen (GAY 1956, REBHUN 1956, SWIFT 1956, MERKER 1961); ein Schema dieser Entstehungsform gibt BENNETT (1956). An den Kernen von Chondroblasten sowie Zellen des Vorknorples (KNESE und KNOOP 1961a) treten sehr häufig Erweiterungen des perinukleären Hofes auf. Wir sahen bläschenartige Abhebungen der äußeren Kernmembran, die dem Kern mit einem mehr oder minder breiten Stiel noch aufsitzen. Perinukleäre Blasen können auch an Kernen der flachen Zellen vorliegen. Die Kernmembran trägt häufig auf der Cytoplasmaseite Ribosomen. Verzweigte Erweiterungen des perinukleären Raumes bedingen Bilder, die denen des endoplasmatischen Retikulums sehr ähnlich sind und dem von BENNETT (1956) gegebenen Schema voll entsprechen. Vergleichbare mit dem Plasmalemm zusammenhängende Formationen fanden wir nicht. Bei den hoch aktiven skeletogenen Zellen liegt die Annahme einer fortlaufenden Neubildung des endoplasmatischen Retikulums nahe.

Dem Ergastoplasma wird eine bedeutsame Rolle bei der Proteinsynthese zugesprochen. Bei den skeletogenen Zellen ist unter anderem an eine Bildung von Skleroproteinen zu denken. Die elektronenmikroskopischen Befunde verschiedener Untersucher sprechen für eine Beteiligung der skeletogenen Zellen an der *Fibrillogenese*: Junge Kollagenfibrillen treten in Nachbarschaft der Bildungszellen auf und die Reifung der Fibrillen schreitet mit ihrem Abstand von diesen Zellen fort. Zum unmittelbaren Nachweis einer sekretorischen Leistung der Zellen im Zusammenhang mit der Fibrillogenese wurden von verschiedenen Seiten Stoffwechseluntersuchungen mit Hilfe von C^{14} bzw. S^{35} markierten Substanzen durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse sprechen zwar ebenfalls für eine Beteiligung der Zellen an der Fibrillogenese, jedoch sind die verwandten Substanzen nach CARNEIRO und LEBLOND (1959) für Kollagen nicht spezifisch. Diesen Autoren gelang engültig der Nachweis der Fibrillenbildung durch Osteoblasten mit Hilfe von Glycin- H^3 , das 30 min nach Verabreichung in Osteoblasten und z.T. schon im präossalen Gewebe abgelagert ist.

Den elektronenmikroskopischen Befunden über die Ausbildung des endoplasmatischen Retikulums entspricht die Reaktionsform der Osteoblasten im Hinblick auf verschiedene Färbemethoden für Ribonukleinsäuren. Die im allgemeinen sehr schwache Farbreaktionen der Chondroblasten haben wir ausführlich erörtert (KNESE und KNOOP 1961a). Das Cytoplasma der Osteoblasten färbt sich unter anderem mit Gallocyanin bzw. mit Methylenblau in einem pH kurz unter 4,0 stark an; diese Reaktion bleibt nach Ribonucleasevorbehandlung aus. Aus dieser Farbreaktion wurde auf einen hohen Gehalt der Osteoblasten an Ribonukleinsäuren geschlossen (unter anderem ASKANAZY 1902, CAPPELIN 1948, HELLER u. Mitarb. 1959, CLAVERT 1950, FOLLIS 1951, PRITCHARD 1952, 1956). Wir konnten weiterhin nach Gallocyanin- und Methylenblaufärbung eine Netzstruktur im Cytoplasma beobachten. Auf eine häufig granuläre Verteilung des basophilen Materials wies auch PRITCHARD (1956) hin. Der Inhalt der Netzmaschen reagiert bei Methylenblaufärbung mitunter leicht metachromatisch. Eine gleichartige Cytoplasmastruktur mit unterschiedlicher metachromatischer Reaktion tritt bei Toluidinblaufärbung in niederem pH auf. Die bei verschiedenen

Färbungen zu beobachtende Netzstruktur des Cytoplasma ist vermutlich als ein Äquivalent der im elektronenmikroskopischen Bilde kenntlichen Verteilung des endoplasmatischen Retikulums anzusehen.

Die Farbreaktion der Osteoblasten besonders gegenüber Toluidinblau weist darauf hin, daß in diesen Zellen nicht nur RNS, sondern auch andere Substanzen auftreten. TONNA und CRONKITE (1959) geben eine α - und β -Metachromasie bei Toluidinblaufärbung an. Diese Verfasser meinen, daß das orthochromatische Material vermutlich das metachromatische verdeckt. In diesem Zusammenhang ist auf die starken Ablagerungen von S^{35} in der Kambiumschicht hinzuweisen (DZIEWIATKOWSKI 1952, 1958, BÉLANGER 1954 a, b, AMPRINO 1955 u. a.). Die durch Färbemethoden nachweisbaren KH unterliegen in ihrer Verteilung anscheinend großen Schwankungen (FOLLIS und BERTHRONG 1949, PRITCHARD 1952, 1956, TONNA und CRONKITE 1959, KNESE 1959 a, KNESE und KNOOP 1961 a). Vermutlich hängen diese Differenzen damit zusammen, daß KH nicht nur als Baustoff, sondern auch als Energiespender in Zellen aufgenommen werden.

Von den polaren Osteoblasten unterscheiden sich nicht nur der Form, sondern auch der Reaktion nach die *flachen Knochenbildungszellen* am Ende der Diaphyse. Ihre metachromatische Reaktion mit Toluidinblau und ihre Färbbarkeit mit Methoden zur Darstellung von Kohlenhydraten, wie z. B. der Polysaccharid-Eisen-Reaktion nach GRAUMANN, ist stärker als die der Osteoblasten, ihre Anfärbbarkeit mit Gallocyanin dagegen geringer. Nach Hyaluronidaseeinwirkung bleibt die Anfärbung mit Toluidinblau bzw. mit Methoden zur Kohlenhydratdarstellung aus. Wir sprachen daher die Vermutung aus (KNESE 1959 a), daß in den polaren Osteoblasten der Diaphsenmitte überwiegend Ribonucleinsäure, in den Knochenbildungszellen am Diaphysenende dagegen vermehrt Mucopolysaccharide bzw. Kohlenhydrate auftreten. Das elektronenmikroskopisch in den flachen Knochenbildungszellen nachweisbare endoplasmatische Retikulum und die schwache, nach Ribonucleaseeinwirkung fehlende Gallocyaninreaktion sprechen für das gleichzeitige Vorhandensein von Ribonucleinsäuren. Nach KOBURG (1961) beträgt die Eiweißumsatzrate der spindelförmigen Osteoblasten auch nur 76% der kuboiden.

In früheren Veröffentlichungen (KNESE und KNOOP 1959, 1961 a) wurde die Umgestaltung der Zellen im Perichondrium von Stammzellen über Prächondroblasten zu Chondroblasten auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen beschrieben. Neben der Formänderung des Zelleibes und Zellkernes in diesem Entwicklungsgang ist die Erweiterung der *Zisternen* des endoplasmatischen Retikulums zu beachten. Die sackartigen Zisternen sind mit einem elektronenmikroskopisch homogenen, dichten Material erfüllt. Die Verteilung von Zellen mit solchen Zisternensäcken verhält sich spiegelbildlich zum Auftreten einer Metachromasie der Interzellulärsubstanz und den von verschiedenen Autoren nachgewiesenen Orten der S^{35} -Ablagerung. Daher wurde die Vermutung ausgesprochen, daß in dieser Umgestaltung des endoplasmatischen Retikulums ein cytologisches Äquivalent der Bildung des Mucopolysaccharid-Protein-Komplexes vorliegt. Beachtenswert erscheint, daß die Chondroblasten im Gegensatz zu den Osteoblasten mit einer größeren Anzahl von Färbemethoden keine oder nur eine sehr schwache Reaktion aufzeigen. Es könnte daran gedacht werden (KNESE und KNOOP 1961 a), daß die Größe der spezifischen Zellstrukturen, voran der Zisternen, so

gering ist (3000—4000 Å), daß eine eventuelle Anfärbung im Lichtmikroskop nicht zu erkennen ist. Auf der anderen Seite verhalten sich aber die Chondroblasten ähnlich wie die Zellen der Eröffnungszone, die sich ebenfalls gegen eine größere Anzahl von Färbungen refraktär verhalten (KNESE und KNOOP 1961 b). Daher könnte vermutet werden, daß in beiden Zellformen niedermolekulare Stoffe vorliegen, die bei der üblichen Präparationstechnik fast vollständig herausgelöst werden.

Ähnliche Zisternenweiterungen, nur von geringerem Umfange wie in den Chondroblasten, zeigen die Osteoblasten (KNESE und KNOOP 1958). Die metachromatische neben der orthochromatischen Reaktion der Osteoblasten spricht dafür, daß diese Zisternenweiterungen ebenfalls mit der Bildung eines Mucopolysaccharides im Zusammenhang stehen. Die unterschiedliche metachromatische Reaktion des Netzwerkes und der Netzmaschen in Osteoblasten mit Toluidinblau legt die Annahme nahe, daß ein reagierendes Substrat sowohl in den erweiterten Zisternen als auch im Grundplasma vorhanden ist. Aus der Färbung — hellrot violett im Grundplasma und dunkel violett im Netzwerk — ist vielleicht auf einen verschiedenartigen Zustand der Mucopolysaccharide zu schließen. Allerdings kann eine Änderung des Farbtones auch durch das gleichzeitige Auftreten anderer Substanzen, vor allem wohl von Proteinen, bedingt sein; eine Überdeckung des metachromatischen Farbtones durch einen orthochromatischen haben TONNA und CRONKITE (1959) vermutet. Seit langem ist bekannt, daß die Ränder neu gebildeter Knochenbälkchen eine metachromatische Reaktion zeigen. Wir konnten feststellen, daß sowohl die Faserstruktur des Periostes als auch die der Ränder der Knochenbälkchen nach Einwirkung von Hyaluronidase deutlicher zutage tritt.

Unseren früheren Erörterungen (KNESE und KNOOP 1959, 1961 a) fügen wir hinzu, daß SHELTON (1960) bei heilender Rachitis Erweiterungen der Zisternen an Osteoblasten beobachtet hat. Dieser Autor äußert seine Auffassung in einer Zeichnung, wonach diese Zisternen sich an der Zelloberfläche unmittelbar zum extrazellulären Raum hin öffnen und ihr Material abgeben, das sich zu Fibrillen und zur Matrix polymerisiert. MOORE und SCHOENBERG (1960) haben in Zellen der Whartonschen Sulze rundliche, voneinander getrennte Zelleinschlüsse mit einem kolloidähnlichen Einschluß gefunden. Sie vermuten, daß diese Organellen den Ort der Synthese oder den Stapelplatz für Vorstufen der Hyaluronsäure darstellen; jedenfalls soll ein Material vorliegen, das ein Substrat für β -Glucuronidase ist. Darüber hinaus meinen die Verfasser, daß die Zellen sowohl zur Produktion von KH als auch Fibrillenmaterial fähig sind. Ähnliche Einschlüsse haben wir ebenfalls, wenn auch sehr selten, gefunden. Dem Bilde nach erinnern sie an Strukturen, die OBERLING (1959) als fettige Degeneration der Mitochondrien nach partieller Hepatektomie abgebildet hat.

GODMAN und PORTER (1960) haben über die Bildung des Vorkorpels der Ratte ähnliche Befunde wie wir erhoben. Auch im Hinblick auf Chondroblasten und Chondrozyten liegen weitgehend übereinstimmende Beobachtungen für Kern, Mitochondrien usw. vor; ebenso weisen die Autoren auf die schwer zu beurteilenden Zustände der Zellmembran der Chondroblasten hin. Die großen Säcke in Chondroblasten und Chondrozyten sehen die Verfasser aber als Teile des Golgi-Apparates an. Sie beschreiben wie wir, daß Teile des Ergastoplasmas durch die Anschwellung der Säcke an die Peripherie der Zelle gedrückt werden. Die großen homogenen Bezirke innerhalb des Cytoplasmas ohne Membranhülle werden als Abkömmlinge solcher Golgiblasen nach Verschwinden der Membranen geschildert. Die homogen erscheinende Substanz halten die Autoren für Glykogen. Darüber hinaus bestehe zwischen Ergastoplasma, Golgikomplex und Plasmalemm eine „dynamische Kontinuität“.

Unter genauer Beobachtung der topographischen Verhältnisse haben KNESE und KNOOP (1959, 1961 a) wahrscheinlich gemacht, daß die großen Säcke schrittweise entstehende Erweiterungen der Zisternen sind. Bezüglich des Übertrittes des Materials der Zisternen in

den Zelleib haben wir offen gelassen, ob ein Durchtritt durch die Membranen oder deren Auflösung erfolgt. Wir konnten keine Beobachtungen über die Entstehung der größeren, annähernd homogenen Bezirke ohne Membranhüllung innerhalb des Cytoplasmas machen; diese Ansammlungen wurden von verschiedener Seite als Glykogen angesehen. Der Austritt der Substanzen aus der Zelle soll nach GODMAN und PORTER (1960) eine Änderung des Zustandes der Interzellulärsubstanzen hervorrufen, wie wir das auch aus der Änderung des färbereichen Verhaltens der Interzellulärsubstanz erschlossen haben. GODMAN und PORTER bringen das endoplasmatische Retikulum nur mit der Bildung von Proteinen, Zellproteinen, dem Proteinanteil, der sich mit den Polysacchariden verbindet, Kollagen usw., in Verbindung. Die von diesen Verfassern beschriebenen größeren Bläschen in Kernnähe mit einer Doppelmembran haben wir erst an Zellen der Eröffnungszone (KNESE und KNOOP 1961 b), aber nicht in Chondroblasten und Chondrozyten gesehen. GODMAN und PORTER (1960) haben sich ausführlich mit der Fibrillogenese auseinandergesetzt und die Primärfibrillen in innigem Kontakt mit der Zelle gefunden; an diesen Orten findet sich kein Plasmalemm, sondern ein verdichtetes Ektoplasma, unter dem ein sog. leerer Raum liegt. Im Hinblick auf den Ort der Fibrillogenese, ob Perichondrium, prächondrale Zone oder Knorpel, machen die Verfasser leider keine näheren Angaben.

MERKER (1961) hat anlässlich von Untersuchungen der Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen auch Mitteilungen über den Ort der MPS-Bildung gemacht. Er findet erweiterte Zisternen, wie KNESE und KOOP (1959, 1961 a) sie für Chondroblasten beschrieben haben. Er kommt zu dem Schluß, daß die MPS-Bildung an kleine bläschenartige Bildungen im Zusammenhang mit dem endoplasmatischen Retikulum gebunden ist.

Wir wenden uns noch einer kurzen Erörterung weiterer Zellorganellen zu, der Mitochondrien und des Golgi-Apparates. *Mitochondrien* sind in Osteoblasten seit langem bekannt (DUBREUIL 1913, DEINEKA 1914, FELL 1925, HILL 1936, FISCHER 1948, PRITCHARD 1952). Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist Form, Größe und Zahl der Mitochondrien in Chondroblasten und Osteoblasten etwa gleich. Im Hinblick auf die Verteilung innerhalb der Zellen werden jene Abschnitte bevorzugt, die der Knorpel- oder Knochenbildungsfront benachbart sind.

An Hand lichtmikroskopischer Untersuchungen (FELL 1925, HILL 1936, PRITCHARD 1952) wurde für Osteoblasten auch ein *Golgi-Apparat* beschrieben. ROSE (1961) hat in vitro an Osteoblasten des Hühnchens den Golgi-Komplex im Hinblick auf die Vitalfärbung und zytochemisches Verhalten untersucht. ASCENZI und BENEDETTI (1959) sowie SHELDON (1960) haben auch elektronenmikroskopisch Golgi-Elemente aufgefunden. Wir sahen wie GODMAN und PORTER (1960) in Chondroblasten einen Golgi-Apparat mit einer geringen Anzahl glatter Membranen, in den Chondrozyten der Appositionszone glatte Membranen in großer Menge (KNESE und KNOOP 1961 a). In beiden Zellformen konnten wir auch enge Beziehungen zwischen Golgi-Apparat und Ergastoplasma beobachten. KARRER (1960 a, b) nimmt eine Beteiligung des Golgi-Apparates an der Glykogensynthese in Leberzellen an; eine ähnliche Aufgabe dieses Organells in Chondroblasten und Chondrozyten bei der Bildung von Polysacchariden kann erwogen werden. GODMAN und PORTER (1960) halten die großen Vakuolen mit dichtem homogenem Inhalt für Teile des Golgi-Apparates (s. oben). ZELANDER (1959) hat aber für Chondrozyten das Vorhandensein eines Golgi-Apparates abgelehnt. In gestaltlich modifizierten Chondrozyten der Eröffnungszone, die KNESE und KNOOP (1961 b) helle Zellen nannten, treten ebenfalls Golgi-Elemente auf; in ihrer Nähe finden sich mitunter Kalknadeln des Knorpels. Wir haben dagegen weder in polar gebauten noch flachen Osteoblasten am Diaphysenende Gebilde gefunden, die eindeutig als Golgi-Elemente anzusprechen sind. Sehr selten beobachteten wir in flachen

Knochenbildungszellen Strukturen (Abb. 3), die vielleicht einen Teil des Golgi-Apparates darstellen. In verdämmernden Zellen zwischen Perichondrium und Knorpel erscheinen neben größeren Vakuolen kleinere Bläschen, die vermutlich von Golgi-Elementen abzuleiten sind. Bemerkenswert erscheint uns, daß CARNEIRO und LEBLOND (1959) das erste Auftreten von Glycin-H³ in Odontoblasten in einer Art Golgi-Zone angeben, aber eine entsprechende Lokalisierung für Osteoblasten nicht beschreiben. So haben wohl weitere Untersuchungen zu klären, ob und in welcher Form Golgi-Elemente in skeletogenen Zellen auftreten.

2. Die Beziehungen der Zellen zu ihrer Umgebung

Wir haben die Beziehung der Chondroblasten zu ihrer Umgebung ausführlich erörtert (KNESE und KNOOP 1961a). Unsere Beobachtungen ließen uns vermuten, daß die Materialabgabe durch Chondroblasten mit einer Änderung des Zustandes der Zellmembran (vgl. GODMAN und PORTER 1960) verbunden ist, die durch Chondrozyten dagegen nicht. In anderem Zusammenhange (KNESE und TITSCHAK 1961) führten wir dieses unterschiedliche Verhalten darauf zurück, daß einmal die Neubildung von Strukturelementen, zum anderen eine Ausreifung durch Stoffeinbau in vorhandene Strukturen als sog. Zuwachs vorliegt; der Zuwachs ist besonders deutlich bei Kollagenfibrillen in der Zunahme ihrer Periode und Dicke. PORTER und PAPPAS (1959) und WASSERMANN (1956) sehen in der Bildung der Primärfibrillen in Zellnähe und dem anschließenden interzellulärem Wachstum, der Reifung, ebenfalls verschiedenartige Vorgänge; das Wachstum soll durch Aufnahme von in Neutralsalzen löslichem monomeren (Tropo-)Kollagen, abgegeben von Fibroblasten, erfolgen.

Ein Gestaltswandel der Osteoblasten wurde verschiedentlich beschrieben (HINTZSCHE 1927, CLAVERT 1950, McLEAN und URIST 1955, PRITCHARD 1952, 1956, KNESE 1956). Vor allem ist zwischen ruhenden und tätigen Osteoblasten zu unterscheiden (DISSE 1908, PRITCHARD 1952, 1956, KNESE 1956, KNESE und KNOOP 1958). Lichtmikroskopisch ist zu beobachten, daß sich ruhende Osteoblasten bei der Fixierung und Entwässerung durch Schrumpfung von den Knochenbälkchen leicht ablösen, tätige Osteoblasten dagegen den Trabekeln mit breitem Fluß aufsitzen. Wie unsere früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, ist an aktiven Osteoblasten in Nachbarschaft des präossalen Gewebes eine Zellmembran nicht eindeutig oder überhaupt nicht aufzufinden; in dieser Untersuchung konnten wir diesen Befund bestätigen. Die Veränderungen des Membranzustandes treten nur in Nachbarschaft des präossalen Gewebes auf. So liegt die Vermutung nahe, daß ein solches Unsichtbarwerden der Zellmembran auch bei Osteoblasten das Äquivalentbild einer massiven Materialausschüttung und der Neubildung von Strukturelementen ist.

Wir erörtern die Morphologie der flachen Zellen und den Zelluntergang gesondert. Die flachen Knochenbildungszellen am Ende der Diaphyse unterscheiden sich von den polar gebauten Osteoblasten durch ihre Gestalt und ihre Farbreaktionen, weniger dagegen durch ihre elektronenmikroskopisch darstellbare Struktur. Vor allem in den knochen nahen Zellschichten sind die Beziehungen der Zellen zueinander sehr verwickelt. Bei lichtmikroskopischen Untersuchungen entsteht der Eindruck, daß ein Synzytium vorliegt (DANTSCHAKOFF 1909, STUDNÍČKA 1912, RANKE 1913, PETERSEN 1919, LUBOSCH 1928). Wir nehmen jedoch

an, daß zwei benachbarte Zellen, die mit einer Art von Zähnen ineinander greifen, durch Zellmembranen begrenzt sind. Auf der Längsseite der Zellen in Nachbarschaft des präossalen Gewebes konnten wir auf unseren Aufnahmen dagegen streckenweise keine Zellmembran erkennen; die Beziehungen der flachen Knochenbildungszellen zum präossalen Gewebe entsprechen damit jenen der polaren Osteoblasten.

3. Der Zelluntergang

Bei Erörterung des sog. Zellunterganges in der Knorpel- und Knochenbildungsfront ist zu prüfen, ob dieser Vorgang im Zusammenhang mit einer Stoffproduktion steht oder als einfache Zelldegeneration anzusehen ist. Lichtmikroskopisch ist seit langem bekannt, daß bei der Knorpel- und Knochenbildung ein Zellschwund auftritt. Einige entsprechende Befunde sind bereits bei MÜLLER (1858) und GEGENBAUR (1864) zu finden (weitere Lit. bei KNESE 1956). Ausführlicher hat sich wohl zuerst WALDEYER (1865) mit der Bedeutung dieses Verdämmerns von Zellen beschäftigt. Für den Knorpel hat SCHAFER (1930) und neuerlich LEWKE (1958) auf ähnliche Vorgänge hingewiesen. Diesen Zellen wurde unter anderem ein besonderes Augenmerk im Hinblick auf die Frage gewidmet, ob Knochengewebe durch Umwandlung von Zellen oder durch Sekretion entsteht (vgl. HINTZSCHE 1927). Im Gegensatz zu den polaren Osteoblasten, bei denen sozusagen eine Ausscheidung von Knochengewebe im Sinne einer quasi apokrinen Sekretion (KNESE 1956) bzw. meroplastischen Differenzierung (WEIDENREICH 1923c) stattfindet, sprachen wir bei diesen Zellen von einer quasi holokrinen bzw. holoplasmatischen Sekretion. PETERSEN (1919) meint, in jedem Falle findet eine Stoffsynthese statt (s. unten). Wir äußerten die Vermutung, daß mit dem Verdämmern von Zellen ähnlich wie mit der Pyknose (LEUCHTENBERGER 1950) eine Proteinsynthese verbunden ist (KNESE 1956).

Die einem Untergang anheimfallenden Zellen sind ihrer Gestalt nach an die Zellen des Appositionsknorpels anzuschließen. Sie treten im Bereich des Appositionsknorpels in Höhe der encoche d'ossification auf und sind unter dem periostalen Knochen bis zur Höhe der Eröffnungszone bzw. noch darüber hinaus anzutreffen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen vermuten, daß der Zellschwund im Knorpel- und Knochengewebe unterschiedlich abläuft. Der Appositionsknorpel enthält in den gelenknahen Gebieten mehr rundliche, anschließend ovoide Chondrozyten. Bei Annäherung an die encoche d'ossification nehmen diese Chondrozyten eine längliche abgeflachte Gestalt an. In Höhe des periostalen Ringes und damit des Säulenknorpels strecken sich die Zellen weiterhin. Lichtmikroskopisch ist an der Längsseite des stäbchenförmigen Kernes kein Cytoplasma mehr zu erkennen; an die Kernpole schließen sich aber noch Cytoplasmahauben an. Das Cytoplasma dieser Zellen färbt sich besonders mit Methoden zur Darstellung von Kohlenhydraten und Mucopolysacchariden (Toluidinblau, Polysaccharid-Eisen-Reaktion) stark an.

Elektronenmikroskopisch sind in den knorpelnahen Teilen des Perichondriums im engsten Kontakt mit Chondroblasten schmale, etwa 1μ breite Zellen anzutreffen. Ihr Kern besitzt ein grobes randständiges Chromatin. Die Cytoplasmastruktur entspricht wegen des Fehlens eines endoplasmatischen Retikulums derjenigen einer Reihe von Chondroblasten, wie sie früher beschrieben wurden (KNESE

und KNOOP 1961 a). Es kann zur Zeit nicht entschieden werden, ob diese Chondroblasten ohne endoplasmatisches Retikulum die Vorgänger bzw. Stammzellen der schmalen Zellen sind. Auch in den Zelltrümmern innerhalb der Interzellularsubstanz fehlen Reste eines endoplasmatischen Retikulums. Dagegen sind Mitochondrien stets vorhanden, ferner Bläschen unbekannter Art (Golgi-Elemente?) und osmiophile Einlagerungen. Die Größe dieser Elemente innerhalb der Interzellularsubstanz mit Resten von Zellorganellen ist besonders in der Breite mit 1000-2000 Å so gering, daß lichtmikroskopisch der Eindruck von verdämmern den Zellen entsteht.

Die noch erkennbaren Strukturelemente des Cytoplasmas unterscheiden diese verdämmern den Zellen von den Elementen im Bereich der Entstehung des *Gelenkspaltes*. In der Nähe des Gelenkspaltes findet offensichtlich eine echte Degeneration statt. Unter der Tangentialfaserschicht liegen Chondrozyten mit der Struktur der Zellen des Epiphysenknorpels. Von diesen Chondrozyten lassen sich zwei „morphologische“ Reihen des Zellunterganges ableiten. Bei den Zellen der einen Reihe bleiben zunächst weite von Membranen eingerahmte Zisternen erhalten, deren Inhalt aber von geringerer elektronenmikroskopischer Dichte als in den Zisternen anderer Knorpelzellen ist. Das Grundplasma besteht aus verschieden großen Granula in dichter Lagerung. Im weiteren Verlauf der Degeneration verliert der Zisterneninhalt an Dichte und das Grundplasma schrumpft zu dichten, unstrukturierten verzweigten Bändern zusammen. Schließlich tritt eine Verschmälerung der Zisternen ein, die Reste des Grundplasmas werden zu undefinierbaren Massen an der Oberfläche des Gelenkknorpels. Eine andere, seltenere Degenerationsreihe zeichnet sich auch im elektronenmikroskopischen Bilde dadurch aus, daß Zellreste mit noch mehr oder minder kenntlichen Zellorganellen langsam verdämmern, d.h. bis an die Grenze der Unsichtbarkeit geraten. Ob dieser Zelluntergang mit der Produktion von Stoffen (Hyaluronsäure!) im Zusammenhang steht, ist schwer zu entscheiden. Es wurde angenommen (MUNARON 1954a, b), daß sich der Gelenkspalt durch Auflösung der Interzellularsubstanz mittels Hyaluronidase bildet. Der Eiweißumsatz der Zellen in der Tangentialfaserschicht mißt nach KOBURG (1961) 13% von dem der kubischen Osteoblasten und liegt in der Größenordnung des Umsatzes der Oberflächenepithelien des Verdauungs- und Atmungsapparates. Die Zellen der Radiär- und Basalschicht haben einen geringeren Umsatz von 8 bzw. 1,5% bezogen auf die kubischen Osteoblasten.

Der Vorgang des Zellunterganges läuft je nach Material in differenter Form ab, wie nicht nur unsere eigenen Untersuchungen am Knorpel und Knochen, sondern auch Vergleiche mit den Beobachtungen von KAJIKAWA u. Mitarb. (1959) an Fibroblasten und BELLAIRS (1961) an Hühnerkeimscheiben zeigen (vgl. KALLIUS 1931, GLÜCKSMANN 1951). Das unterschiedliche Verhalten degenerierender Zellen läßt vermuten, daß diesen Vorgängen eine bestimmte Bedeutung zukommt.

Hauptbestandteil der Zellreste an der Grenze von Knorpel zu Periost bzw. präossalem Gewebe ist jeweils ein langer schmaler Kern. Hinzu treten Vakuolen unbekannter Natur sowie Mitochondrien und einige Elemente des endoplasmatischen Retikulums. Die Kerne besitzen weite Poren, in deren Nähe sich größere, 150 Å messende, Granula anhäufen. Da ähnliche Granula auch jenseits eines solchen Porus im präossalen Gewebe anzutreffen sind, kann an eine Materialausschüttung aus dem Kern gedacht werden. Mitunter ist eine Abgrenzung des

Kernes durch Membranen gegen die Cytoplasmareste auf unseren Aufnahmen nicht möglich. Diesen verdämmerten Zellen benachbart ist ein fibrillenreiches präossales Gewebe, z.T. bereits mit Einlagerung einzelner Haufen von Kalkkristallen.

Zunächst ist zu erörtern, ob die Zellschatten innerhalb des präossalen Gewebes Abkömmlinge der platten Zellen sind. Auf Grund unserer elektronenmikroskopischen Untersuchungen können wir diese Frage nicht eindeutig beantworten. Unter Beachtung der lichtmikroskopischen Beobachtungen, die die Untersuchung eines größeren Bereiches ermöglichen, vermuten wir jedoch einen Zusammenhang zwischen beiden Strukturelementen. Die Hypothese liegt nahe, daß sich die flachen Zellen mit fortschreitender Bildung präossalen Gewebes bis zur Erschöpfung aufbrauchen und damit verdämmern (s. unten). Die in diesen Zellresten nachweisbaren Zellorganellen sprechen für eine letzte sekretorische Leistung im Sinne von PETERSEN (1935). An der Grenze von Knorpel zu Perichondrium ist auf Grund der erhaltenen Organellen des Zelleibes und der histochemischen Reaktionen an eine Bildung von KH bzw. Mucopolysacchariden zu denken; im subperiostalen Bereich überwiegen dagegen Kernreste. Damit ist eher eine Synthese von (Sklero-)Proteinen anzunehmen.

Für das Knorpelgewebe hat SCHAFFER (1930) den Zelluntergang meisterhaft beschrieben und die Bezeichnung „Verdämmern von Zellen“ geprägt. Weit verbreitet ist nach SCHAFFER die einfache Atrophie oder Hyoplasie von Zellen. Beim Verdämmern verlieren die Kerne ihre Basophilie und die scharfe Abgrenzung gegen das Cytoplasma; die ganze Zelle wandelt sich in eine homogene Masse um. In anderen Fällen erfährt sie samt Kern eine „chondromukoide“ Umwandlung, die einer Art Verflüssigung gleichkommt.

Ein Teil der älteren Autoren (KAPSAMER 1897, STUDNIČKA 1907, DISSE 1911) begnügte sich mit der Beschreibung der untergehenden Zellen während der Osteogenese, andere (v. BRUNN 1874, BIDDER 1906) bezeichneten diesen Vorgang als eine Art Degeneration. WALDEYER (1865), KASSOWITZ (1879), DIBBELT (1911) und TÖRÖ (1935) dachten an eine Umwandlung in Interzellulärsubstanz. Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen kann nun eindeutig festgestellt werden, daß *keine Umwandlung* in Interzellulärsubstanz stattfindet. Auf Grund der Struktur dieser Zellen ist anzunehmen, daß die *Stoffsynthese* in ähnlicher oder gleicher Form wie bei den polaren Osteoblasten vor sich geht. Diese Beobachtungen stimmen mit den von BARGMANN u. Mitarb. (1961) entwickelten Vorstellungen über die Morphologie der Sekretion überein, die bei Untersuchung der Milchsekretion die Begriffe merokrin, apokrin und holokrin einer Kritik unterzogen haben. Nach diesen Autoren haben sich bisher keine Anhaltspunkte für eine einfache Umwandlung von Cytoplasma in Sekret ergeben; sie schlagen vor, die Drüsen in solche einzuteilen, in denen die Zellen bei der Sekretion erhalten bleiben, und solche, deren Elemente im Ablauf der Sekretion zugrunde gehen. Es besteht damit keine Berechtigung mehr, den Terminus „Verknöcherung“ (ossification) zu gebrauchen, der durch Knochenbildung oder Osteogenese zu ersetzen ist, ähnlich wie Verkalkung durch Mineralisation. Obwohl flache Zellen und polare Osteoblasten eine recht gleichartige Struktur besitzen, sind auch weiterhin zwei Bildungsformen voneinander zu unterscheiden; das zeitlich und örtlich verschiedene Auftreten (KNESE 1956, BÄHLING 1958) und das weitere Schicksal der jeweiligen Bildungszellen ist als hinreichendes Unterscheidungsmerkmal anzusehen.

Es ist zu erwägen, ob das Verdämmern von Zellen wegen der Umschließung durch Knochensubstanz der Einmauerung von Osteozyten ähnelt. Bei der Osteozytenbildung geht die Polarität der ursprünglichen Osteoblasten aber erst nach vollständiger Umhüllung durch Knochensubstanz verloren. Ein Osteoblast umgibt sich nämlich nicht selbst mit Knochengewebe, sondern der periphere Anteil des Knochenhöhlchens wird von Osteoblasten der nächsten Schicht gebildet. Bei den flachen Zellen wird, soweit unsere Beobachtungen reichen, Interzellulärsubstanz sowohl in peripherer als auch zentraler Richtung gebildet, d. h. eine Polarität der Zellen ist nicht vorhanden.

Über das Wesen dieses Zellunterganges können z. T. nur Vermutungen geäußert werden. Das ausgebildete Knochengewebe ist zellärmer als das Periost (MOLLIER 1910, TÖRÖ 1935). ERNST (1926) meinte, daß Zellen zugrunde gehen, wenn deren begrenzte Energiemenge verbraucht ist. Es ist durchaus möglich, daß jeder Zelle nur eine bestimmte Stoffwechselkapazität zukommt. Wenn die Stoffwechselrate der Skelettbildung höher liegt als die des ausgebildeten Gewebes, ist für das skeletogene Gewebe eine größere Zellzahl zu veranschlagen als für das Knochen- oder Knorpelgewebe. Die Differenz der für den Stoffwechsel erforderlichen Zellzahl in beiden Gewebeorten mag dann durch einen Zelluntergang ausgeglichen werden; dabei ist der Zelluntergang mit einer Stoffsynthese verbunden, die bis zur Erschöpfung (s. oben) des Zellindividuums im Sinne einer letzten sekretorischen Leistung führt. Die relative Zellarmut des Knochengewebes gegenüber dem Periost beruht aber nicht nur auf einem Untergang von Zellen in der Bildungsfront. Bereits durch die Bildung der Interzellulärsubstanz rücken die Zellen auseinander. Durch die folgende Reifung des Knochengewebes, u. a. Zunahme der Dicke der Kollagenfibrillen und ihrer Periode (s. u.), wird die Flächendichte der Osteozyten, d. h. ihre Zahl je Flächeneinheit des Schnittes, weiter herabgesetzt. Die Flächendichte der Osteozyten beträgt in einem Schnitt durch die Mitte der Tibia subperiostal beim Neugeborenen $1850/\text{mm}^2$, bei einem 43jährigen Manne $794/\text{mm}^2$ und in der Nähe der Markhöhle 910 bzw. $737/\text{mm}^2$. Damit vergrößert sich der Abstand der Osteozyten voneinander von $23,3 \mu$ auf $36,8 \mu$ (vgl. KNESE und TITSCHAK 1961).

4. Die Fibrillogenese

Nach Erörterung der Gestalt und färberischen Reaktion der skeletogenen Zellen ist nun Ort und Zeit der Entstehung der Interzellulärsubstanz zu besprechen.

Im Hinblick auf den Ort der Faserbildung bestehen zwischen Chondro- und Osteogenese beachtliche Unterschiede. Im Perichondrium werden Kollagenfibrillen in nicht allzu großer Anzahl in den Interzellulärräumen sichtbar. Den Ausführungen von GODMAN und PORTER (1960), die sich mit der Fibrillenbildung bei der Chondrogenese beschäftigen, ist nicht zu entnehmen, ob ihre Beobachtungen nur für die Chondroblasten oder auch die Chondrozyten gelten. In der Knorpelbildungsfront ist keine Fibrillenvermehrung zu beobachten. Auch im Knorpel scheint die Fibrillenbildung gegenüber der Synthese der Interfibrillärsubstanz zurückzutreten (KNESE und KNOOP 1961a). In der Kambiumschicht des Periostes fehlen dagegen Fibrillen fast vollständig; die Bildungszellen sind hier dicht aneinandergesetzt. Die Kollagenfibrillen entstehen subperiostal als erstes morphologisch sichtbares Kennzeichen des sog. präossalen Gewebes. Der Abstand zwischen den Fibrillen ist bedeutend kleiner als im Knorpel. In einiger Entfernung von den polaren Osteoblasten treten Fibrillengruppen auf (KNESE und KNOOP 1958).

Aber nicht nur der Ort der Fibrillogenese ist bei Knorpel- und Knochengewebe voneinander verschieden, sondern auch der Umfang der Synthese. Der Menge der gebildeten Fibrillen geht etwa die Ausbildung des endoplasmatischen Retikulums in den Bildungszellen parallel, d. h. die Anzahl der Membranpaare ist in Osteoblasten größer als in Chondroblasten. Die Fibrillogenese ist gleichzeitig mit einer Strukturbildung verbunden. Eine bestimmte Ordnung der Fibrillen im jungen Knorpel ist zwar auf unseren elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht erkennbar, doch ist auch für das prächondrale Gewebe eine charakteristische Verlaufsform der Fibrillen wie im präossalen Gewebe zu vermuten.

Im periostalen Knochen liegt eine *Schichtung* von Fibrillen unterschiedlicher Verlaufsrichtung vor. Die Schichten haben eine Dicke von 0,7 bis etwa 1,3 μ . Damit besitzt das bisher als Faserknochen angesehene Knochengewebe der Ratte einen Aufbau wie der davon unterschiedene sog. lamelläre Knochen. In gefärbten Präparaten erscheinen diese Fibrillenlamellen wohl als grobe Fasern bzw. Faserbündel. Es wurde demgemäß auch von einem grobfaserigen Knochen gegenüber dem sog. feinfaserigen oder lamellären gesprochen (WEIDENREICH 1930). Im polarisierten Licht erscheint diese Form des Knochengewebes z. T. als sog. Faserfilz (KNESE, VOGES und RITSCHL 1954) bzw. als strähnenartiges Knochengewebe (M. MEYER 1927, KNESE, VOGES und RITSCHL 1954). Der Faserfilz läßt überhaupt keine Fibrillenorientierung im polarisierten Licht erkennen; das strähnenartige Knochengewebe besteht aus größeren oder kleineren Komplexen verschiedenen orientierter Fasermassen, die in sich eine Gliederung vermissen lassen. Beide Gewebeformen wurden bei kleineren Nagetieren nachgewiesen (ERTELT 1955).

Bei Untersuchung menschlicher Knochen fiel auf, daß sowohl in der Wand von Osteonen als auch in den Tagentiallamellen, den sog. Schaltlamellen, Faserfilzbezirke in eine echte lamelläre Struktur übergehen (KNESE, VOGES und RITSCHL 1954). Einen gleichartigen Befund konnte ERTELT (1955) bei vielen Säugetieren erheben. In den Faserfilzen ist häufig eine Orientierung der Osteozytenhöhlen zu beobachten, wie sie dem lamellären Knochen zukommt (KNESE 1957). Wir haben daher solche Faserfilze im polarisierten Licht kombiniert mit Phasenkontrastverfahren untersucht und gewannen den Eindruck, daß in ihnen eine sehr feine Lamellierung vorliegt (KNESE 1957). Darauf sprachen wir die Vermutung aus, daß die Fibrillen in den Faserfilzen ihren endgültigen Durchmesser noch nicht erreicht haben.

Die Fibrillendicke nimmt bereits in Osteoblastennähe von 300 auf 430 Å zu (KNESE und KNOOP 1958); ähnliche Beobachtungen für die Knorpelfibrillen liegen von GODMAN und PORTER (1960) vor. Die Fibrillenreifung verläuft vermutlich in periostalem und chondralem Knochen etwas unterschiedlich. Die Dicke der Fibrillen in jungem periostalem Knochen ist mit etwa 430 Å gleich jener der Fibrillen in präossalem Gewebe, aber die Periode auf 500 Å angewachsen; der Durchmesser der Fibrillen im chondralen Knochen beträgt 800 Å, die Periode 400 Å. Die Fibrillenreifung ist mit einer Abnahme der Zahl der Fibrillen je Flächeneinheit des Schnittes, der Flächendichte, von $340/\mu^2$ in Osteoblastennähe auf $90/\mu^2$ in jungem periostalem Knochen verbunden.

Auf Grund polarisationsoptischer Untersuchungen sprachen wir die Vermutung aus, daß die Lamellenstruktur des frühen chondralen Knochens sich von der des periostalen unterscheidet (KNESE 1957). Auch hierfür konnten wir elektronenmikroskopisch mit der Feststellung einer Lamellendicke von 5–8 μ

im chondralen und $2-4\mu$ im periostalen Knochen eine Bestätigung finden. Größere Bezirke anscheinend regelloser Fibrillenlagerung im chondralen Knochen entsprechen wohl sog. Faserfilzbezirken.

Unsere vergleichend polarisationsmikroskopischen und phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen verschieden alten Knochengewebes zeigen, daß das Knochengewebe jener Rinderfeten, die auch zur histochemischen Untersuchung kamen, ebenfalls eine lamelläre Struktur besitzt. Das Knochengewebe des Rindes wird als „in toto konzentrischer Knochen“ bezeichnet (KÖLLIKER 1889, GEBHARDT 1906, PETERSEN 1930, AMPRINO und GODINA 1947), wobei ERTELT (1955) von Großlamellen sprach. Es handelt sich aber um einen trabekulären Knochen, bei dem die Ordnung der Trabekel nach Dicke und Verlaufsweise besonders regelmäßig ist und nicht um eine besondere Gewebeform. Bei Untersuchung im polarisierten Licht zeigen alle Gefäßräume eine lamelläre Hülle. Die Lamellen sind im periostalen Knochen dünner, weniger als $2-4\mu$ dick, als im chondralen Knochen, in dem ihre Dicke $5-8\mu$ beträgt. Zwischen je zwei lamellären Gefäßwänden liegt ein Zwischengewebe, das aus Faserbündeln, besser wohl Lamellen besteht, deren Ordnung schwer zu erkennen ist. Unsere Untersuchungen über dieses „Zwischengewebe“ sind noch nicht abgeschlossen. In der Lamellenstruktur der Gefäßwände läßt sich ein Gefälle von der Markhöhle zum Periost insofern feststellen, als die Lamellendifferenzierung in Marknähe weiter vorangeschritten ist. Wir (KNESE und TITSCHAK 1961) haben uns bei Darstellung der Baugeschichte des Knochengewebes mit dem Differenzierungsgefälle über den Querschnitt ausführlich beschäftigt.

Die Beobachtungen einer in unmittelbarer Nachbarschaft von Osteoblasten auftretenden lamellären Fibrillenschichtung entsprechen den älteren Auffassungen (unter anderem GEGENBAUR 1864, WALDEYER 1865, WEIDENREICH 1930), die eine rhythmische Tätigkeit der Osteoblasten für die Lamellenentstehung verantwortlich machen. Allerdings konnten wir nicht erkennen, worauf die Bildung von Fibrillen unterschiedlicher Verlaufsweise beruht. Es erscheint uns daher müßig, z. Z. irgendwelche Hypothesen über „richtende“ Faktoren bei der Fibrillogenese der Skeletorgane aufzustellen, von denen aus Untersuchungen der Fibrillenbildung in vitro eine ganze Reihe bekannt ist.

5. Chondrogenese und Osteogenese

Die vorstehenden Erörterungen beschränken sich auf jene Befunde, die nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse geeignet erscheinen, die Unterschiede zwischen Knorpel- und Knochenbildung zu charakterisieren. Wir verzichten dabei auf Wiedergabe der bekannten Differenzen im Auftreten von Enzymen, da hierzu keine eigenen Untersuchungen vorliegen. Abgesehen von einer abweichenden qualitativen und quantitativen Zusammensetzung von Knorpel- und Knochengewebe lassen sich bei Bildung beider Skeletgewebe raumzeitliche Unterschiede in der Entstehung der einzelnen Gewebekomponenten feststellen.

Beim Vergleich von Chondroblasten und Osteoblasten fällt die verschiedenartige Anfärbbarkeit beider Zellen auf. Die zur Verfügung stehenden Färbemethoden können wegen ihrer geringen Spezifität über die jeweils vorliegenden Stoffe nur beschränkt Auskunft geben. Von diesen Stoffen ist jedoch anzunehmen, daß sie auf Grund ihrer wahrscheinlich hochmolekularen Struktur in den verwandten Fixierungs- und Entwässerungsmitteln unlöslich sind. Hochmole-

kulare unlösliche Stoffe würden, nach dem Färbungsergebnis zu schließen, bereits in den Osteoblasten auftreten. Stoffe gleicher Molekularstruktur erscheinen im Laufe der Chondrogenese in nachweisbarer Menge erst in der Interzellulärsubstanz des Appositionsknorpels. Damit würde ein Unterschied zwischen Chondrogenese und Osteogenese hinsichtlich des Ortes der Bildung hochmolekularer Interfibrillärsubstanzen bestehen.

Aber nicht nur die Molekularstruktur dieser Stoffe, sondern auch ihre absolute Menge ist in Chondroblasten und Osteoblasten unterschiedlich. Die Masse eines solchen Stoffes dürfte in Chondroblasten so gering sein, daß sie selbst bei Anfärbung im Mikroskop nicht zu erkennen ist (KNESE und KNOOP 1961 a). Bei diesen Substanzen handelt es sich, wenn von den Faserproteinen abgesehen wird, um Polysaccharide und Proteine, z.T. von Kollagen verschieden, sowie um Verbindungen zwischen beiden. Die Natur und Struktur dieser Stoffe konnte bisher nicht befriedigend aufgeklärt werden (Lit. bei KNESE und KNOOP 1961 a).

Die Fibrillogenese im Laufe der Knorpelbildung spielt sich zum größeren Teil bereits im Perichondrium ab, bei der Knochenbildung jedoch erst in der Knochenbildungsfront. Demgemäß sind die Interzellulärräume zwischen den Chondroblasten relativ weit, zwischen den Osteoblasten sehr eng, d.h. die Osteoblasten liegen in der Form eines Pseudoepithels dicht aneinandergefügt. Die entstehenden Fibrillen zeigen eine bestimmte Verlaufsweise: Mit der Bildung der Faserkomponente ist auch eine Strukturbildung verbunden (vgl. KNESE und TITSCHAK 1961). Im präossalen Gewebe sind in Osteblastennähe bereits Lamellen zu beobachten, eine Fibrillenordnung im prächondralen Gewebe ist z.Z. nur zu vermuten.

Die Fibrillen in Knorpel- und Knochengewebe unterscheiden sich auch in ihrer Dicke und Periode, die anorganischen Kristallite haben in beiden Geweben verschiedene Länge und Dicke (Lit. bei KNESE und KNOOP 1961 a, b).

Eine mehrzeitige Entstehung des Knochengewebes wurde verschiedentlich behauptet (SPULER 1899, v. EBNER 1906, 1909, v. KORFF 1906, PETERSEN 1919, 1935, ROBINSON 1952, KNESE 1956). Eine Analyse der raum-zeitlichen Ordnung der Bildung der Gewebekomponenten wurde aber erst durch elektronenmikroskopische Untersuchungen möglich.

Der unterschiedlichen zeitlichen Abfolge der Bildung der Komponenten von Knorpel- und Knochengewebe entsprechen aber auch Differenzen im Bildungsort, da beide Gewebe in ihrer strukturellen Gesamtheit nicht in der sog. Bildungsfront entstehen. Die Bildungsvorgänge beginnen mit der Umwandlung von Stammzellen zu Prächondroblasten und Präosteoblasten und führen über Chondroblasten und Osteoblasten zum prächondralen und präossalen Gewebe; sie werden als Reifung in den ausgebildeten Geweben fortgesetzt. Entsprechend der verschiedenen zeitlichen Folge werden die Komponenten beider Gewebe auch nicht an homologen Orten gebildet, d.h. die Knorpelfibrillen z.B. entstehen im Perichondrium, die Knochenfibrillen an der Grenze zum präossalen Gewebe, die hochmolekularen organischen Interfibrillärsubstanzen beim Knorpel in der Bildungsfront, beim Knochen bereits in den Osteoblasten. Diese Feststellungen gelten nur für die frühe Fetalzeit. Einer besonderen Erörterung bedürfen die in späten Fetalzeiten und postnatal auftretenden Formen der Osteogenese, wie jene unter Vorbildung von Fasern (v. KORFF 1906, KNESE 1956) und wie die Bildung von periostalen Tangentiallamellen und Kleinstosteonen (KNESE 1956, KNESE und TITSCHAK 1961).

Diese Feststellungen über Zeit und Ort der Synthese der Gewebekomponenten können einige bisher schwer verständliche Tatsachen aufklären. Vor allem ist es nun möglich, zu untersuchen, durch welche Vorgänge in der Knorpel- bzw. Knochenbildung die entscheidenden Eigenheiten des entsprechenden Gewebes entstehen. Für den Knorpel scheinen die organischen Interfibrillärsubstanzen, die Mucopolysaccharide, für den Knochen die Fibrillen (KNESE und TITSCHAK 1961) die charakterisierenden Komponenten darzustellen. Offensichtlich liegt in dem sog. physiologischen Osteoid oder präossalen Gewebe bereits Knochengewebe vor, obwohl an diesem Ort erst die Mineralisation abläuft. Zur Kennzeichnung eines bestimmten Skeletgewebes ist vermutlich nicht das Vorhandensein *sämtlicher* Gewebekomponenten und Struktureigentümlichkeiten notwendig. Wie schwierig die Beurteilung des Gewebezustandes sein kann, zeigten Studien über die Struktur der Sehnen- und Bandansätze (BIERMANN 1957, KNESE und BIERMANN 1958). Die Mineralisation des Epiphysenknorpels geht erst kurz vor der Eröffnungszone vor sich (KNESE und KNOOP 1961 b), wobei kaum zu entscheiden ist, ob hierin ein „physiologischer“ oder „regressiver“ Vorgang zu sehen ist. Das an die präossalen und prächondralen Zonen anschließende Knorpel- und Knochengewebe ist kein fertiges „ausdifferenziertes“ Gewebe, sondern unterliegt Reifungsvorgängen, auf die wir z.T. im Vorstehenden hingewiesen haben und für das Knorpel- (KNESE und KNOOP 1961 a) und Knochengewebe (KNESE und TITSCHAK 1961) in anderem Zusammenhange eingegangen sind.

Zusammenfassung

1. Im Anschluß an vorangegangene Untersuchungen werden Knorpel- und Knochenbildung verglichen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an der Tibia von Rattenfeten, die lichtmikroskopischen an Rattenfeten und am Metacarpus von Rinderfeten durchgeführt. Lichtmikroskopisch haben wir das färberische Verhalten der skeletogenen Zonen untersucht. Ferner wurden Beobachtungen im polarisierten Licht sowie mit dem Phasenkontrastverfahren gemacht.

2. Die *skeletogene Zone* wird als *Perichondrium* bezeichnet, wenn sie aus Chondroblasten aufgebaut ist, als *Periost*, wenn Osteoblasten vorliegen. In den skeletogenen Zonen vergleichen wir Chondroblasten, flache Knochenbildungszellen am Ende der Diaphysenschale, polare Osteoblasten und deren Stammzellen miteinander.

3. Zwischen den Chondroblasten liegen weite interzelluläre Spalten, die Fibrillen oder Fibrillenbündel enthalten. Die Chondroblasten sind durch ein mäßig ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum mit perlschnurartigen Auftreibungen der Zisternen ausgezeichnet. Bei Anwendung der verschiedensten Färbemethoden färbt sich ihr Cytoplasma nur wenig oder überhaupt nicht an.

4. Zwischen den polar differenzierten Osteoblasten treten nur sehr schmale interzelluläre Spalten fast ohne Fibrillen auf. Die Osteoblasten haben ein stark entwickeltes endoplasmatisches Retikulum mit Zisternenerweiterung in Nähe des präossalen Gewebes. Ihr Cytoplasma färbt sich mit Galloeyanin, mit Methylenblau von niedrigem p_H und mit Toluidinblau (metachromatisch) an. Hierbei wird eine Netzstruktur des Cytoplasmas kenntlich, die wir für ein Äquivalent des endoplasmatischen Retikulums ansehen.

5. Die flachen Knochenbildungszellen am Ende der Diaphysenschale weichen in ihrer Form, aber nicht in ihrer elektronenmikroskopisch faßbaren Struktur von den polar differenzierten Osteoblasten ab. Nach dem färberischen Verhalten mit entsprechender enzymatischer Kontrolle ist anzunehmen, daß in den flachen Zellen MPS, in den polar gebauten Osteoblasten vermehrt RNS auftreten. Die flachen Zellen liegen in mehreren Schichten übereinander, die durch präossales Gewebe getrennt sind.

6. Mit den verdämmernden Zellen im prächondralen und präossalen Gewebe haben wir die Chondrozyten des Gelenkknorpels verglichen. Die Zellen der Tangentialfaserschicht, die regressiven Veränderungen unterliegen, zeigen in einem schwach ausgebildeten endoplasmatischen Retikulum gleichmäßig erweiterte Zisternen und ein vermindertes sowie in seiner Struktur verdichtetes Hyaloplasma; seltener sind bei anderen Zellen noch „Schatten“ von Zellorganellen zu erkennen. Der Zelluntergang in der Tangentialfaserschicht ist möglicherweise mit einer Stoffproduktion (Hyaluronidase?) verbunden.

7. Die verdämmernden Zellen des prächondralen Gewebes sind durch die Erhaltung von Zellorganellen charakterisiert, die mitunter nackt in die Interzellularsubstanz des Knorpels eingebettet sind; Kernfragmente sind selten oder fehlen ganz. Die verdämmernden Zellen im präossalen Gewebe sind dagegen durch das Vorhandensein von Kernresten und nur wenigen Cytoplasmaorganellen gekennzeichnet. Auf Grund des färberischen Verhaltens ist anzunehmen, daß von beiden Zellformen als letzte sekretorische Leistung Bestandteile der Interzellularsubstanz gebildet werden. Hierbei kommt es zu einer „Erschöpfung“ und damit zum „Verdämmern“ der Zellen. Eine direkte Umwandlung von Cytoplasma in Interzellularsubstanz, wie sie von manchen lichtmikroskopischen Untersuchern angenommen wurde, findet nicht statt.

8. Die Fibrillenbildung erfolgt bei der Chondrogenese ausschließlich oder überwiegend im Perichondrium, bei der Osteogenese in der Knochenbildungsfront. Die (hochmolekularen) organischen Interfibrillärsubstanzen, MPS, KH usw., sind bereits in den polar gebauten Osteoblasten und den flachen Knochenbildungszellen, bei der Chondrogenese aber erst in der Knorpelbildungsfront färberisch darzustellen.

9. Bei der Osteogenese ist mit der Bildung der Gewebekomponenten eine *Strukturbildung* verbunden, da in unmittelbarer Nähe der Osteoblasten die Fibrillen in Schichten, Lamellen, von wechselnder Verlaufsweise auftreten. Diese Lamellen sind nicht nur elektronenmikroskopisch, sondern auch im polarisierten Licht nachzuweisen. Vermutlich hat auch der junge Knorpel eine bestimmte Faserstruktur.

10. Der unterschiedliche Aufbau von Knorpel- und Knochengewebe ist nach unseren Erhebungen unter anderem auf eine verschiedene Reihenfolge der Bildung der Gewebekomponenten zurückzuführen. Der zeitlich verschiedene Ablauf führt dazu, daß die gleichen Komponenten für beide Gewebe an einander nicht entsprechenden (homologen) Orten entstehen, d.h. die Knorpelfibrillen werden im Perichondrium, die Knochenfibrillen in der Bildungsfront, die hochmolekularen Interfibrillärsubstanzen in den Osteoblasten bzw. in der Knorpelbildungsfront gebildet.

Literatur

- AMPRINO, R.: Distribution of S 35-sodium sulfate in early chick embryos. *Experientia* (Basel) **11**, 1—6 (1955).
- Uptake of 35 S in the differentiation and growth of cartilage and bone. In Ciba Found. Symposium on bone structure and metabolism, pp. 89—102. London: J. & A. Churchill 1956.
- , e G. GODINA: La struttura delle ossa nei vertebrati. *Comm. Pont. Acad. Sci.* **11**, 329—462 (1947).
- ASCENZI, A., and E. L. BENEDETTI: An electron microscopic study of the foetal membranous ossification. *Acta anat.* (Basel) **37**, 370—385 (1959).
- ASKANAZY, M.: Über das basophile Protoplasma des Osteoblasten, Osteoklasten und anderer Gewebszellen. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **13**, 369—378 (1902).
- BAHLING, G.: Die Entwicklung des Querschnittes der großen Extremitätenknochen bis zum Säuglingsalter. *Morph. Jb.* **99**, 109—188 (1958).
- BARGMANN, W., K. FLEISCHHAUER u. A. KNOOP: Über die Morphologie der Milchsekretion. II. Zugleich eine Kritik am Schema der Sekretionsmorphologie. *Z. Zellforsch.* **53**, 545—568 (1961).
- BÉLANGER, L. F.: Autoradiographic visualization of S 35 incorporation and turnover by the mucous glands of the gastro-intestinal tract and other soft tissues of rat and hamster. *Anat. Rec.* **118**, 755—771 (1954a).
- Autoradiographic visualization of the entry and transit of S 35 in cartilage, bone, and dentine of young rats and the effect of hyaluronidase in vitro. *Canad. J. Biochem.* **32**, 161—169 (1954b).
- Autoradiographic visualization of the entry and transit of S 35 methionine and cystine in the soft and hard tissues of the growing rat. *Anat. Rec.* **124**, 555—580 (1956a).
- Autoradiographic studies of the formation of the organic matrix of cartilage, bone and the tissues of teeth. In Ciba Found. Symposium on bone structure and metabolism. London: J. & A. Churchill, Wolstenhalme and O'Connor (CF) 1956b.
- BELLAIRS, R.: Cell death in chick embryos as studied by electron microscopy. *J. Anat.* (Lond.) **95**, 54—60 (1961).
- BENNETT, ST.: The concepts of membrane flow and membrane vesiculation as mechanisms for active transport and ion pumping. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 99—104 (1956).
- BENNINGHOFF, A.: Der funktionelle Bau des Hyalinknorpels. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.* **26**, 1—54 (1925).
- BEVELANDER, G., and P. L. JOHNSON: A histochemical study of the development of membrane bone. *Anat. Rec.* **108**, 1—21 (1950).
- BIDDER, A.: Osteobiologie. *Arch. mikr. Anat.* **68**, 137—213 (1906).
- BRUN, A. v.: Beiträge zur Ossifikationslehre. *Arch. Anat. Phys.* 1—17 (1874).
- CAPELLIN, M.: Contributo alla citologia funzionale degli osteoblasti. *Boll. So. ital. Biol. sper.* **24**, 1228—1229 (1948).
- CARNEIRO, J., and C. P. LEBLOND: Role of osteoblasts and odontoblasts in secreting the collagen of bone and dentin, as shown by radioautography in mice given tritium-labeled-glycine. *Exp. Cell Res.* **18**, 291—300 (1959).
- CASSELMAN, B.: Histochemical technique. London: Methuen & Co. 1959.
- CLAVERT, J.: Sur la teneur en acide ribonucléique des cellules de l'os. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **231**, 998—999 (1950).
- DANTSCHAKOFF, W.: Über die Entwicklung des Knochenmarks bei den Vögeln und über dessen Veränderung bei Blutentziehung und Ernährungsstörungen. *Arch. mikr. Anat.* **74**, 855—894 (1909).
- DEINEKA, D.: Die Entwicklung der Knochenzellen im perichondralen Prozeß. *Anat. Anz.* **46**, 97—126 (1914).
- DIBBELT, W.: Beiträge zur Histogenese des Skeletgewebes und ihren Störungen. *Beitr. path. Anat.* **50**, 411—436 (1911).
- DISSE, J.: Über die Bildung des Knochengewebes. *S.-B. Ges. Naturwiss. Marburg* **5**, 111—121 (1908).
- Über die Bildung der Grundsubstanz des Knochengewebes. *Verh. Anat. Ges. Erg.-H. z. Anat. Anz.* **38**, 137—143 (1911).
- DZIEWIATKOWSKI, D. D.: Radioautographic studies of sulfatesulfur (S 35) metabolism in the articular cartilage and bone of suckling rats. *J. exp. Med.* **95**, 489—496 (1952).
- Autoradiographic studies with S 35-sulfate. *Rev. Cytol.* **7**, 159—194 (1958).

- EBNER, V. v.: Über die Entwicklung der leimgebenden Fibrillen, insbesondere im Zahnbein. S.-B. Akad. Wiss. Wien, Abt. III, **115**, 281—346 (1906).
- Über scheinbare und wirkliche Dentinfasern des Zahnbeins. Anat. Anz. **34**, 289—309 (1909).
- ERNST, M.: Über Untergang von Zellen während der normalen Entwicklung bei Wirbeltieren. Z. Anat. **79**, 228—262 (1926).
- ERTELT, W.: Untersuchungen über Körpergröße und Knochenstruktur bei Säugetieren. Zool. Jb., Abt. Anat. u. Ontog. **74**, 588—638 (1955).
- FELL, H. F.: The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. J. Morph. **40**, 417—459 (1925).
- FISCHER, A.: Amino-acid metabolism of tissue cells in vitro. Nature (Lond.) **161**, 1008 (1948).
- FOLLIS jr., R. H.: Histochemical studies on cartilage and bone. Ascorbic acid deficiency. Bull. Johns Hopk. Hosp. **89**, 9—20 (1951).
- , and M. BERTHRONG: Histochemical studies on cartilage and bone. (Abstract.). Amer. J. Path. **24**, 685 (1948).
- — Histochemical studies on cartilage and bone. I. The normal pattern. Bull. Johns Hopk. Hosp. **85**, 281—297 (1949).
- GAY, H.: Chromosome-nuclear membrane-cytoplasmic interrelations in Drosophila. J. biochys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 407—414 (1956).
- GEBHARDT, W.: Über funktionell wichtige Anordnungsweisen der feinen und groben Bauelemente des Wirbeltierknochens. II. Spezieller Teil. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **20**, 187—322 (1906).
- GEDIGK, P.: Histochemische Methoden. Biochemisches Taschenbuch. Heidelberg: Springer 1956.
- GEIGENBAUR, C.: Über die Bildung des Knochengewebes. Jena Z. Med. Naturwiss. **1**, 343—369 (1864).
- GLÜCKSMANN, A.: Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. Biol. Rev. **26**, 59—86 (1951).
- GODMAN, G. C., and K. R. PORTER: Chondrogenesis, studied with the electron microscope. J. biophys. biochem. Cytol. **8**, 719—760 (1960).
- GRAUMANN, W.: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion. Acta histochem. (Jena) **6**, 1—7 (1958).
- GREULICH, R. C., and C. P. LEBLOND: Radioautographic visualization of radiocarbon in the organs and tissues of newborn rats following administration of c 14-labelled bicarbonate. Anat. Rec. **115**, 559—585 (1953).
- HAGUENAU, F.: The ergastoplasm: its history, ultrastructure and biochemistry. Rev. Cytol. **7**, 425—484 (1958).
- HELLER, M., F. C. McLEAN and W. BLOOM: Cellular transformations in mammalian bones induced by parathyroid extract. Amer. J. Anat. **87**, 315—348 (1950).
- HILL, J. C.: The cytology and histochemistry of osteoblasts grown in vitro. Arch. exp. Zellforsch. **18**, 496—511 (1936).
- HINTZSCHE, E.: Die Osteoblastenlehre und die neueren Anschauungen vom normalen Verknöcherungsvorgang. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **27**, 413—463 (1927).
- JACKSON, S. F.: The formation of connective and skeletal tissues. Proc. roy. Soc. B **142**, 536—548 (1954).
- , and R. H. SMITH: Fibrogenesis of connective and skeletal tissues in the embryonic fowl. Symp. Soc. exp. Biol. **9**, 89—96 (1955).
- KAJIKAWA, K., T. TANI and R. HIRONO: Electron microscopic studies on skin fibroblasts of mouse, with special reference to the fibrillogenesis in connective tissue. Acta path. jap. **9**, 61—80 (1959).
- KALLIUS, E.: Der Zelluntergang als Mechanismus bei der Histo- und Morphogenese. Verh. Anat. Ges. Erg.-H. z. Anat. Anz. **72**, 10—22 (1931).
- KAPSAMER, S.: Die periostale Ossifikation. Arch. mikr. Anat. **50**, 315—350 (1897).
- KARRER, H. E.: Electron-microscopic study of glycogen in chick embryo liver. J. ultrastruct. Res. **4**, 191—212 (1960a).
- Electron-microscopic observations on developing chick embryo liver. J. ultrastruct. Res. **4**, 149—165 (1960b).
- KASSOWITZ, M.: Die normale Ossifikation und die Erkrankung des Knochensystems bei Rachitis und hereditärer Syphilis. Med. Jb. **1879**, 145—223.
- KNESE, K.-H.: Die periostale Osteogenese und Bildung der Knochenstruktur bis zum Säuglingsalter. Z. Zellforsch. **44**, 585—643 (1956).
- Die chondrale diaphysäre Osteogenese bis zur Geburt. Z. Zellforsch. **47**, 80—113 (1957).

- KNESE K.-H.: Knochenstruktur als Verbundbau, Versuch einer technischen Deutung der Materialstruktur des Knochens. Zwangslose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie, herausgeg. von W. BARGMANN u. W. DOERR, H. 4. Stuttgart: Georg Thieme 1958.
- Neuere Untersuchungen über die Knochenbildung und ihre Beeinflussungsmöglichkeiten. Dtsch. zahnärztl. Z. **14/15**, 925—932, 990—1000 (1959a).
- Die Ultrastruktur des Knochengewebes. Dtsch. med. Wschr. **84**, 1640—1644 (1959b).
- The ultrastructure of bone. Germ. med. Monthly **4**, 427—431 (1959c).
- , u. A.-M. KNOOP: Elektronenoptische Untersuchungen über die periostale Osteogenese. Z. Zellforsch. **48**, 455—478 (1958).
- Elektronenmikroskopische Befunde über die Mucopolysaccharidbildung. 9. Tagg Dtsch. Ges. für Elektronenmikroskopie Freiburg i. Br. 1959 (Programm und Autorenreferate).
- Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen am Knorpelgewebe über den Ort der Bildung des Mucopolysaccharid-Protein-Komplexes. Z. Zellforsch. **53**, 201—258 (1961a).
- Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Zellen in der Eröffnungszone des Epiphysenknorpels. Z. Zellforsch. **54**, 1—38 (1961b).
- , u. S. TITSCHAK: Untersuchungen mit Hilfe des Lochkartenverfahrens über die Osteonstruktur von Haus- und Wildschweinknochen sowie Bemerkungen zur Baugeschichte des Knochens. Morph. J. 1961 (im Druck).
- D. VOGES u. I. RITSCHL: Untersuchungen über die Osteon- und Lamellenformen im Extremitätenskelet des Erwachsenen. Z. Zellforsch. **40**, 323—360 (1954).
- KÖLLICKER, A.: Handbuch der Gewebelehre des Menschen, 6. Aufl., Bd. I. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1889.
- KORFF, K. v.: Die Analogie in der Entwicklung der Knochen- und Zahnbeingrunds substanz der Säugetiere nebst kritischen Bemerkungen über die Osteoblasten und Osteoblastenlehre. Arch. mikr. Anat. **69**, 515—543 (1906).
- LEUCHTENBERGER, C.: A cytochemical study of pyknotic nuclear degeneration. Chromosoma (Berl.) **3**, 449—473 (1950).
- LEWKE, J.: Über atoplastische Zellen im Aryknorpel des Kalbes. Z. mikr.-anat. Forsch. **64**, 13—17 (1958).
- LIPP, W.: Neuuntersuchungen des Knochengewebes. Morphologie, Histochemie und Beeinflussung durch das periphere, vegetative Nervensystem durch Fermente und Hormone. Acta anat. (Basel) **20**, 162—200 (1954).
- LUBOSCH, W.: Die Osteoblasten und ihre Metamorphose. Z. mikr.-anat. Forsch. **12**, 279—346 (1928).
- MCLEAN, F. C., and M. R. URIST: Bone: an introduction to the physiology of skeletal tissue. Chicago: University Chicago Press 1955.
- MERKER, J.-K.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen. Z. Zellforsch. **53**, 411—430 (1961).
- MEYER, M.: Über eine eigentümliche Art von Knochengewebe beim erwachsenen Menschen (dem lamellösen, feinfaserigen strahlenartigen Markknochen) und über den embryonalen Markknochen. Knochenstudien an dem menschlichen Labyrinthknorpel IV. Z. Anat. **83**, 734—751 (1927).
- MOLLIER, S.: Über Knochenentwicklung. S.-B. Ges. Morph. u. Physiol. München **26**, 1—11 (1910).
- MONESSE, B., e G. BETTINI: L'indagine istochimica applicata alla fisiopatologia del tessuto osseo. Parte prima: ossificazione normale. Arch. Putti Chir. Organi Mov. **10**, 326—372 (1958).
- MOORE, R. D., and M. D. SCHOENBERG: Studies on connective tissue. VI. The cytoplasm of the fibroblast. Exp. Cell Res. **20**, 511—518 (1960).
- MÜLLER, G.: Über eine Vereinfachung der Reaktion nach HALE (1946). Acta histochem. (Jena) **2**, 68—70 (1955/56).
- Die Darstellung saurer Mucopolysaccharide durch die Toluidinblau-Metachromasie, die Alcianblaufärbung, die PAS-Reaktion und die Ferrihydroxydsol-PAS-Reaktion. Acta histochem. (Jena) **6**, 218—224 (1959).
- MÜLLER, H.: Über die Entwicklung der Knochensubstanz nebst Bemerkungen über den Bau rachitischer Knochen. Z. Zool. **9**, 147—233 (1858).
- MUNARON, G.: Osservazioni istofisiche ed istochimiche sul mesenchima intermedio delle articolazioni embrionali e su suoi derivati. Boll. Soc. Biol. sper. **30**, 919—922 (1954a).
- Rilievi istochimici ed istofisici sul mesenchima intermedio delle articolazioni embrionali e su suoi derivati. Atti Soc. ital. anat., Suppl. zu Monitore zool. ital. **63**, 347—349 (1954b).

- OBERLING, CH.: The structure of cytoplasm. *Rev. Cytol.* 8, 1—32 (1959).
- PETERSEN, H.: Studien über Stützsubstanzen. I. Über die Herkunft der Knochenfibrillen. S.-B. heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl., Abt. B, 11. Abh. 1919.
- Histologie und mikroskopische Anatomie. München: J. F. Bergmann 1935.
- PORTER, K. R., and G. D. PAPPAS: Collagen formation by fibroblasts of chick embryo dermis. *J. biophys. biochem. Cytol.* 1, 153—165 (1959).
- PRATT, C. W. M.: Observations on osteogenesis in the femur of the foetal rat. *J. Anat. (Lond.)* 91, 533—544 (1957).
- PRITSCHARD, J. J.: A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *J. Anat. (Lond.)* 86, 259—277 (1952).
- The Osteoblast. The biochemistry and physiology of bone, edit. by G. H. BOURNE, p. 179—211. 1956.
- PUTSCHAR, W. G.: General pathology of the musculo-skeletal system. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. III/2, S. 364—488. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- RANKE, O.: Neue Kenntnisse und Anschauungen von dem mesenchymalen Syncytium und seiner Differenzierungsprodukte unter normalen und pathologischen Bedingungen gewonnen mit der Tanninsilbermethode von N. ACHUCARRO. S. B. heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. Abh. 4, 1913.
- REBHUN, L. J.: Electron microscopy of basophilic structures of some invertebrate oocytes. *J. biophys. biochem. Cytol.* 2, 93—104 (1956).
- ROBINSON, R. A.: An electron-microscopic study of the crystalline inorganic component of bone and its relationship to the organic matrix. *J. Bone Jt. Surg. A* 34, 389—435 (1952).
- ROMEIS, B.: Histologische Technik. München: Leibnitz 1948.
- ROSE, G. G.: The golgi complex in living osteoblasts. *J. biophys. biochem. Cytol.* 9, 463—478 (1961).
- SCHAEFFER, J.: Die Stützgewebe. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. II/2, S. 1—390. 1930.
- SCOTT, B. L., and D. PEASE: Electron microscopy of the epiphyseal apparatus. *Anat. Rec.* 126, 465—495 (1956).
- SHELDON, H.: Observations on the production of matrix by bone and cartilage cells. *Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie*, Delft 1960.
- and R. A. ROBINSON: Electron microscope studies of crystal-collagen relationships in bone. IV. The occurrence of crystals within collagen fibrils. *J. biophys. biochem. Cytol.* 3, 1011—1015 (1957).
- SOGNAES, R. F.: Microstructure and histochemical characteristics of the mineralized tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 60, 545—572 (1955).
- SPULER, A.: Beitrag zur Histogenese des Mesenchyms. *Verh. Anat. Ges.* 13, Erg.-H. z. Anat. Anz. 16, 13—16 (1899).
- STUDNÍČKA, F. K.: Über einige Grundsubstanzgewebe. *Anat. Anz.* 31, 497—522 (1907).
- SWIFT, H.: The fine structure of annulate lamellae. *J. biophys. biochem. Cytol.* 2, Suppl. 4, 415—418 (1956).
- TONNA, E. A., and E. P. CRONKITE: Histochemical and autoradiographic studies on the effects of aging on the mucopolysaccharides of the periosteum. *J. biophys. biochem. Cytol.* 6, 171—178 (1959).
- TÖRÖ, E.: Beiträge zur kausalen Genese der Knorpel- und Knochenentwicklung. *Anat. Anz.* 80, 285—294 (1935).
- WALDEYER, W.: Über den Ossifikationsprozeß. *Arch. mikr. Anat.* 1, 354—375 (1865).
- WASSERMANN, F.: The intercellular components of connective tissue: origin, structure and interrelationship of fibers and ground substance. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.* 35, 240—333 (1956).
- WEIDENREICH, F.: Knochenstudien. I. Über Aufbau und Entwicklung des Knochens und den Charakter des Knochengewebes. II. Über Sehnenverknöcherungen und Faktoren zur Knochenbildung. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 69, 382—466, 558—597 (1923 a).
- Über Differenzierung und Entdifferenzierung. *Arch. mikr. Anat.* 97, 227—250 (1923 b).
- Das Knochengewebe. In *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. II/3, S. 391—520. 1930.
- ZELANDER, T.: Ultrastructure of articular cartilage. *Z. Zellforsch.* 49, 720—738 (1959).

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierter Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.
3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knapster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.
6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung und Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonebildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.
- Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweis Pfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.
7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z. B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.
8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.
10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.



Ergebnisse der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie

Herausgegeben von Professor Dr. P. COHRS, Hannover · Professor Dr.
W. GIESE, Münster i. Westf. · Professor Dr. H. MEESSEN, Düsseldorf

Zuletzt erschien :

41. Band

Mit 77 Abbildungen. IV, 262 Seiten (2 Beiträge in deutscher und 1 Beitrag in englischer
Sprache) Gr.-8^o, 1961. DM 68,—

INHALTSVERZEICHNIS

Über den durch das Alter bedingten Formwandel menschlicher Lungen. Von G. HIERO-
NYMI, Offenbach a. M. · Die doppelseitige chronische nicht-obstruktive interstitielle
Nephritis. Von F. GLOOR, Basel/Schweiz · Nonspecific Resistance. By H. SELYE, Mon-
treal/Canada · Namen- und Sachverzeichnis.

Früher erschien :

40. Band

Mit 81 Abbildungen. IV, 220 Seiten Gr.-8^o, 1960. DM 68,—

INHALTSVERZEICHNIS

Die Pfaundler-Hurlersche Krankheit. Von Privatdozent Dr. Dr. HERMANN A. HIENZ,
Heidelberg · Die Nordamerikanische Blastomykose. Von E. W. CHICK, M. D., H. J.
PETERS, M. D., J. F. DENTON, Ph. D., M. D., und W. D. BORING, Ph. D., Augusta,
Georgia/USA · Die pathologische Anatomie der Südamerikanischen Blastomykose
(Lutzsche Krankheit). Von Professor Dr. AMADEU FIALHO, Rio de Janeiro, Tijuca/Bra-
silien · Orthologie und Pathologie der heterotropen Hämo-poes. Von Professor Dr.
OTTO FRESEN, Düsseldorf · Namen- und Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG